

Rec'd PCT/PTO 22 FEB 2005 42
PCT/IB 03/03470
19.09.03

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 02 OCT 2003

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2002年 8月22日
Date of Application:

出願番号 特願2002-241523
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2002-241523]

出願人 協和醗酵工業株式会社
Applicant(s):

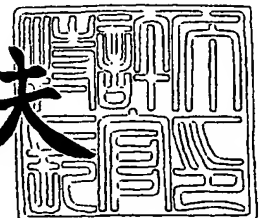
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月 3日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 H14-0724Q4

【提出日】 平成14年 8月22日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 31/55
C07D223/22

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醗酵工業株式
会社 医薬総合研究所内

【氏名】 佐木 真由美

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醗酵工業株式
会社 医薬総合研究所内

【氏名】 野中 裕美

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醗酵工業株式
会社 医薬総合研究所内

【氏名】 宮地 宏昌

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醗酵工業株式
会社 医薬総合研究所内

【氏名】 檜浦 奈緒子

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醗酵工業株式
会社 医薬総合研究所内

【氏名】 真部 治彦

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醗酵工業株式会社 医薬総合研究所内

【氏名】 松村 務

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醗酵工業株式会社 医薬総合研究所内

【氏名】 新井 仁

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内

【氏名】 佐々木 克敏

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内

【氏名】 小畑 長英

【特許出願人】

【識別番号】 000001029

【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

【代表者】 平田 正

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008187

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 図面 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 喘息の予防および／または治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 11 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質を有効成分として含有する喘息の予防および／または治療剤。

【請求項 2】 以下の 1) ～ 4)

- 1) 配列番号 12 記載の塩基配列から選ばれる連続した 5 ～ 60 塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体、
- 2) 配列番号 14 記載の塩基配列から選ばれる連続した 5 ～ 60 塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体、
- 3) 配列番号 18 記載の塩基配列から選ばれる連続した 5 ～ 60 塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体、
- 4) 配列番号 12、14 および 18 から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号 11 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する 5 ～ 60 塩基からなるオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体、
のいずれか一つを有効成分として含有する喘息の予防および／または治療剤。

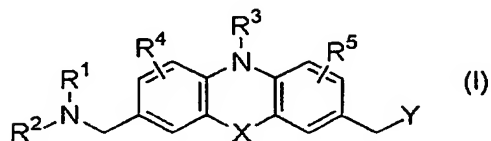
【請求項 3】 以下の 1) ～ 4)

- 1) 配列番号 11 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体、
- 2) 配列番号 13 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体、
- 3) 配列番号 17 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体、
- 4) 配列番号 11、13 および 17 から選ばれるいずれか一つに記載のアミノ酸配列において一つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 11 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を有する蛋白質を認識する抗体、

のいずれか一つを有効成分として含有する喘息の予防および／または治療剤。

【請求項 4】 式 (I)

【化 1】



[式中、 R^1 および R^2 は同一または異なって水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表すか、 R^1 および R^2 が隣接する窒素原子と一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成し、

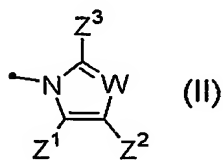
R^3 は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表し、

R^4 および R^5 は同一または異なって水素、低級アルキル、またはハロゲンを表し、

Xは $-(CH_2)_2-$ または $-CH=CH-$ を表し、

Yは式 (II)

【化 2】



(式中、WはCHまたは窒素原子を表し、

Z¹およびZ²は同一または異なって水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表すか、Z¹およびZ²がそれぞれ隣接する2つの炭素原子と一緒にになり置換もしくは非置換の芳香環または置換もしくは非置換の複素環を形成し、

Z³は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換の複素環基、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表す)を表す]

で表される含窒素三環式化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する喘息の予防および／または治療剤。

【請求項5】 R¹およびR²が隣接する窒素原子と一緒にになって置換もしくは非置換の複素環基を形成する請求項4記載の喘息の予防および／または治療剤。

【請求項6】 R³が水素である請求項4または5記載の喘息の予防および／または治療剤。

【請求項7】 R⁴およびR⁵が水素である請求項4～6のいずれかに記載の喘息の予防および／または治療剤。

【請求項8】 Z¹およびZ²がそれぞれ隣接する2つの炭素原子と一緒にになり置換もしくは非置換の複素環を形成する請求項4～7のいずれかに記載の喘息の予防および／または治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、GPR4のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質を有効成分として含有する喘息の予防および／または治療剤に関する。また本発明は、含窒素三環式化合物を有効成分として含有する喘息の予防および／または治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

気管支喘息は気道狭窄と気道過敏性亢進を主な特徴とする炎症性疾患である。現在、吸入ステロイド薬、 β 刺激薬やキサンチン系薬物等の気管支拡張薬、抗ロイコトリエン薬に代表される抗アレルギー薬の組み合わせにより、喘息の日常管理は十分行うことができるとされている。しかし、治療に主として使用されるステロイド薬には副作用があること、ステロイド抵抗性や難治性の患者も存在することから、新しい作用機序を有する副作用の少ない治療剤が求められている。

【0003】

G蛋白質共役型レセプター蛋白質（以下、GPCRと略す）であるGPR4については、肺に高発現していることが知られている〔ゲノミクス（Genomics）、30巻、84-88頁（1995年）〕。また、GPR4は、脂質であるスフィンゴシルホスホリルコリン（SPC）やリゾホスファチジルコリン（LPC）と結合し、シグナルを伝達することが報告されている〔ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（J. Biol. Chem.）、276巻、41325-41335頁（2001年）〕。SPCについては、TNF- α 産生およびICAM-1発現を誘導することが報告され〔ジャーナル・オブ・インベスティゲイティブ・ダーマトロジー（J. Invest. Dermatol.）、112巻、91-96頁（1999年）〕、皮膚疾患等のアレルギー性疾患への関与が示唆されている。LPCについては、単球の遊走〔サーキュレーション・リサーチ（Cir. Res.）、84巻、52-59頁（2000年）〕や内皮細胞での接着分子の発現〔ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション（J. Clin. Invest.）、90巻、1138-1144頁（1992年）〕、マクロファージ活性化〔ジャーナル・オブ・イムノロジー（J. Immunol.）、147巻、273-280頁（1991年）〕等に関与し、炎症に関与していることが報告されている。また、LPCについては喘息患者の血漿中で増加していること〔クリニカル・サイエンス（Clinic. Science）、97巻、595-601頁（1999年）〕やアレルギー患者の抗原チャレンジ後の肺胞洗浄液中で増加すること〔ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン（J. Exp. Med.）、183巻、2235-2245頁（1996年）〕が報告されている。LPC産生を抑制するコリンの投与が喘息患者に効果を示したという報告もある〔インディアン・ジャーナル・オブ・チェスト・

ディーズ・アンド・アライド・サイエンス (Indian J. Chest Dis. Allied Sci.)、39巻、149-156頁 (1997年)]。しかし、SPC、LPCともにGPR4以外にOGR-1 [ネイチャー・セル・バイオロジー (Nat. Cell Biol.)、2巻、261-267頁 (2000年)] やG2A [サイエンス (Science)、293巻、702-705頁 (2001年)] 等にも結合することが知られており、これらの作用がGPR4を介した作用であるかどうかについては知られていない。

【0004】

GPCRには、細胞内で過剰に発現すると、リガンドが存在しなくてもシグナルを流す、構成活性型GPCRと呼ばれるGPCRが存在することが知られている。リガンド非存在時に流れるシグナルは構成的活性と呼ばれる。構成活性型GPCRには、天然に存在するものと、アミノ酸の置換、欠失などの変異を導入することにより造成された変異GPCR [Mol. Pharmacol., 57, 890 (2000)、W098/46995] がある。GPCRの構成的活性を抑制するアンタゴニストはインバースアゴニストと呼ばれる。

【0005】

また、文献 [プレチン・デ・ラ・ソシエテ・シミック (Bulletin de la Societe Chimique)、185頁 (1981年) およびヨーロッパ・ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー (Eur. J. Med. Chem.)、12巻、219頁 (1977年)] に、後述の式 (I) において-NR¹R²がモルホリノを表し、R³、R⁴およびR⁵が水素を表し、Yに相当する置換基がモルホリノであり、Xが $-(CH_2)_2-$ を表す化合物が開示されている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、GPR4のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質を有効成分として含有する喘息の予防および／または治療剤を提供すること、および含窒素三環式化合物を有効成分として含有する喘息の予防および／または治療剤を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明は、以下の(1)～(8)に関する。

(1) 配列番号 11 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質を有効成分として含有する喘息の予防および／または治療剤。

(2) 以下の 1) ~ 4)

1) 配列番号 12 記載の塩基配列から選ばれる連続した 5 ~ 60 塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体、

2) 配列番号 14 記載の塩基配列から選ばれる連続した 5 ~ 60 塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体、

3) 配列番号 18 記載の塩基配列から選ばれる連続した 5 ~ 60 塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体、

4) 配列番号 12、14 および 18 から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号 11 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する 5 ~ 60 塩基からなるオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体、のいずれか一つを有効成分として含有する喘息の予防および／または治療剤。

【0008】

(3) 以下の 1) ~ 4)

1) 配列番号 11 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体、

2) 配列番号 13 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体、

3) 配列番号 17 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体、

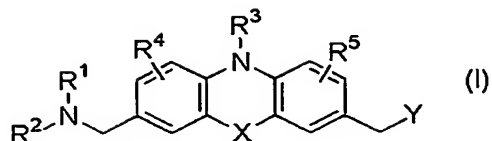
4) 配列番号 11、13 および 17 から選ばれるいずれか一つに記載のアミノ酸配列において一つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 11 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を有する蛋白質を認識する抗体、

のいずれか一つを有効成分として含有する喘息の予防および／または治療剤。

(4) 式 (I)

【0009】

【化3】



【0010】

[式中、 R^1 および R^2 は同一または異なって水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表すか、 R^1 および R^2 が隣接する窒素原子と一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成し、

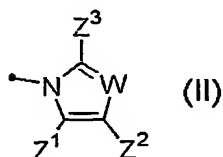
R^3 は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表し、

R^4 および R^5 は同一または異なって水素、低級アルキル、またはハロゲンを表し、
 X は $-(CH_2)_2-$ または $-CH=CH-$ を表し、

Y は式 (II)

【0011】

【化4】



【0012】

(式中、WはCHまたは窒素原子を表し、

Z¹およびZ²は同一または異なって水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表すか、Z¹およびZ²がそれぞれ隣接する2つの炭素原子と一緒にになり置換もしくは非置換の芳香環または置換もしくは非置換の複素環を形成し、

Z³は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換の複素環基、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表す)を表す]

で表される含窒素三環式化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する喘息の予防および／または治療剤。

【0013】

(5) R¹およびR²が隣接する窒素原子と一緒にになって置換もしくは非置換の複素環基を形成する第(4)項に記載の喘息の予防および／または治療剤。

(6) R³が水素である第(4)項または第(5)項に記載の喘息の予防および／または治療剤。

(7) R⁴およびR⁵が水素である第(4)項～第(6)項のいずれかに記載の喘息の予防および／または治療剤。

(8) Z¹およびZ²がそれぞれ隣接する2つの炭素原子と一緒にになり置換もしくは非置換の複素環を形成する第(4)項～第(7)項のいずれかに記載の喘息の予防および／または治療剤。

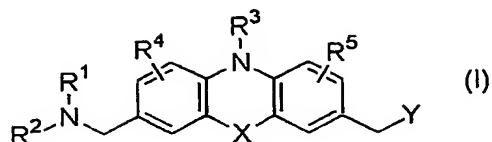
【0014】

さらに本発明は以下の(9)～(15)に関する。

(9) 式(I)

【0015】

【化5】

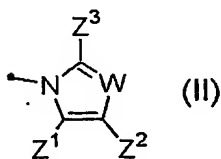


【0016】

[式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 およびXはそれぞれ前記と同義であり、
Yは式 (II)

【0017】

【化6】



【0018】

(式中、W、 Z^1 、 Z^2 および Z^3 はそれぞれ前記と同義である) を表す]
で表される含窒素三環式化合物またはその薬理学的に許容される塩、

(10) R^1 および R^2 が隣接する窒素原子と一緒になって置換もしくは非置換の複素環基を形成する第(9)項に記載の含窒素三環式化合物またはその薬理学的に許容される塩。

(11) R^3 が水素である第(9)項もしくは第(10)項に記載の含窒素三環式化合物またはその薬理学的に許容される塩。

(12) R⁴およびR⁵が水素である第(9)項～第(11)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物またはその薬理学的に許容される塩。

(13) Z¹およびZ²がそれぞれ隣接する2つの炭素原子と一緒にになり置換もしくは非置換の複素環を形成する第(9)項～第(12)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物またはその薬理学的に許容される塩。

(14) 第(9)項～第(13)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する医薬。

(15) 第(9)項～第(13)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能の抑制剤。

【0019】

すなわち、本発明により、第(9)項～第(13)項に記載される新規な含窒素三環式化合物またはその薬理学的に許容される塩が提供され、それらを有効成分として含有する医薬、および配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能の抑制剤が提供される。

【0020】

【発明の実施の形態】

本発明者らは、GPCRであるGPR4の有するシグナル伝達に関する機能を抑制する物質が、喘息の予防および／または治療に有効であるとの新知見を見出し、本発明を完成するに至った。また、本発明者らは、構成活性型のGPCRであるGPR4の構成的活性を抑制する物質の探索を行い、GPR4の構成的活性を抑制する物質が、喘息の予防および／または治療に有効であることを見出した。

【0021】

GPR4の有するシグナル伝達に関する機能を抑制する物質としては、GPR4自身の発現を阻害または抑制する物質、リガンドのGPR4への結合を阻害する物質、GPR4へのリガンド結合により生ずるシグナル伝達を抑制する物質、GPR4の構成的活性により生ずるシグナル伝達を抑制する物質（例えばGPR4のインバースアゴニスト等が含まれる）等が含まれる。上記物質は、これら機能を有する物質であれば、その構造は特に限定されず、公知の構造を有するものでもよい。GPR4としては、

例えば配列番号 11、13 および 17 から選ばれるいずれか一つに記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、あるいは配列番号 11、13 および 17 から選ばれるいずれか一つに記載のアミノ酸配列において一つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 11 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を有する蛋白質等が挙げられる。

【0022】

配列番号 11、13 および 17 から選ばれるいずれか一つに記載のアミノ酸配列において一つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 11 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を有する蛋白質は、文献 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989年) (以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997年) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)等] 記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号 11、13 および 17 から選ばれるいずれか一つに記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより、取得することができる。

【0023】

欠失、置換または付加したアミノ酸の数は特に限定されないが、1個～数十個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個である。

配列番号 11、13 および 17 から選ばれるいずれか一つに記載のアミノ酸配列において一つ以上のアミノ酸残基が欠失、置換または付加したとは、該アミノ酸配列中の任意かつ1もしくは複数の位置において、1または複数のアミノ酸残基の欠失、置換または付加があることを意味し、欠失、置換または付加が同時に生じてよく、欠失、置換または付加されるアミノ酸残基については、天然型と

非天然型とを問わない。天然型アミノ酸残基としては、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-アルギニン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリンおよびL-システインの各残基等が挙げられる。

【0024】

以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の好ましい例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。

A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、O-メチルセリン、tert-ブチルグリシン、tert-ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸

C群：アスパラギン、グルタミン

D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸

E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン

F群：セリン、スレオニン、ホモセリン

G群：フェニルアラニン、チロシン

また、配列番号11、13および17から選ばれるいずれか一つに記載のアミノ酸配列において一つ以上のアミノ酸残基が欠失、置換または付加したアミノ酸配列を有する蛋白質が、配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を有するには、そのアミノ酸配列と配列番号11記載のアミノ酸配列とが、少なくとも75%以上、通常は80%以上、好ましくは90%以上、さらには95%以上の同一性を有していることが好ましい。

【0025】

アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST[Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873(1993)]やFASTA[Methods Enzymol., 183, 63 (1990)]を用いて決定することができる。このアルゴリズムBLASTに

基づいて、BLASTN（塩基対塩基データベース）やBLASTX（塩基対アミノ酸データベース）とよばれるプログラムが開発されている [J. Mol. Biol., 215, 403(1990)]。BLASTに基づいたBLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメーターは例えばscore=100、wordlength=12とする。また、BLASTに基づいてBLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターは例えばscore=50、wordlength=3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる [Gapped BLASTについては文献 (Nuc. Acids Res., 25, 3389-3402 (1997)) を参照]。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 参照)。

【0026】

GPR4自身の発現を阻害または抑制する物質としては、例えば、配列番号12、14および18から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列から選ばれる連続した5～60塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するオリゴヌクレオチド（以下、アンチセンス・オリゴヌクレオチドともいう）、配列番号12、14および18から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制するオリゴヌクレオチド、これらのオリゴヌクレオチドの誘導体（以下、オリゴヌクレオチド誘導体という）等が挙げられる。

【0027】

上記アンチセンス・オリゴヌクレオチドとしては、配列番号12、14および18から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列から選ばれる連続した5～60塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチドであれば特に限定されないが、好ましくは10～60塩基、より好ましくは20～60塩基、さらに好ましくは30～60塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチドが挙げられる。該アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、配列番号12、14および18から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列またはその断片の塩基配列に関する情報に基づき、常法により、例えばDNA合成機を用いることにより調製することができ

る。

【0028】

オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスホアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステルとの結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾリルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等をあげることができる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)]

。

【0029】

上記アンチセンス・オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体を用い、アンチセンスRNA/DNA技術〔バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322 (1992)、化学, 46, 681 (1991)、Biotechnology, 9, 358 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 87 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992)、細胞工学, 16, 1463 (1997)]、トリプル・ヘリックス技術〔Trends in Biotechnology, 10, 132 (1992)]、リボザイム技術〔Current Opinion in Chemical Biology, 3, 274 (1999)、FEMS Microbiology Reviews, 23, 257 (1999)、Frontiers in Bioscience, 4, D497 (1999)、Chemistry & Biology, 6, R33 (1999)、Nucleic Acids Research, 26, 5237 (1998)、Trends in Biotechnology, 16, 438 (1998)]、あるいはデコイDNA法〔Nippon Rinsho - Japanese Journal of Clinical Medicine, 56, 563 (1998)、Circulation Research, 82, 1023 (1998)、Exper

imental Nephrology, 5, 429 (1997)、Nippon Rinsho - Japanese Journal of Clinical Medicine, 54, 2583 (1996)] に準じて、GPR4自身の発現を阻害または抑制することができる。

【0030】

配列番号12、14および18から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチドとは、配列番号12、14および18から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列を有するDNAの一部、または全部をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法、サザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーまたはプラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0 mol/lの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150 mmol/l塩化ナトリウム、15 mmol/lクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNA等を挙げることができる。ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズするヌクレオチドとしては、例えば上記BLASTやFASTA等を用いて計算したときに12、14および18から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列を有するDNAの相補的配列を有するDNAと少なくとも75%以上の相同性を有するDNAが好ましく、より好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するDNAを挙げることができる。ヌクレオチドとしては、DNA、RNA等いずれも用いられるがDNAが好適に用いられる。

【0031】

上記アンチセンス・オリゴヌクレオチドもしくは該アンチセンス・オリゴヌクレオチド誘導体、または配列番号12、14および18から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズ

するヌクレオチドもしくは該ヌクレオチド誘導体を単独でまたはレトロウィルスベクター、アデノウィルスベクター、アデノウィルスアソシエーテッドウィルスベクター等の遺伝子治療用ベクターに挿入した後、下記に記載した常法に従って製剤化したものを喘息の予防および／または治療剤として使用することもできる。

【0032】

遺伝子治療用ベクターを該予防および／または治療剤として用いる場合には、該遺伝子治療用ベクターと遺伝子治療剤に用いる基剤を調合することにより製造することができる [Nature Genet., 8, 42 (1994)]。

上記基剤としては、通常注射剤に用いる基剤であればどのようなものでもよく、例えば蒸留水、塩化ナトリウムまたは塩化ナトリウムと無機塩との混合物等の塩溶液、マンニトール、乳糖、デキストラン、ブドウ糖等の糖溶液、グリシン、アルギニン等のアミノ酸溶液、有機酸溶液または塩溶液とグルコース溶液との混合溶液等が挙げられる。また常法に従い、これらの基剤に浸透圧調整剤、pH調整剤、ゴマ油、ダイズ油等の植物油またはレシチンもしくは非イオン界面活性剤等の界面活性剤等の助剤を加えて、溶液、懸濁液または分散液として注射剤を調製してもよい。これらの注射剤を、粉末化、凍結乾燥等の操作により用時溶解用製剤として調製することもできる。

【0033】

該予防および／または治療剤は、液体の場合はそのまま、固体の場合は、投与直前に、必要により滅菌処理をした上記の基剤に溶解して使用することができる。

投与方法としては、例えば患者の治療部位に吸収されるように、局所的に投与する方法を挙げることができる。また、非ウイルス遺伝子移入法によっても目的とする治療部位にDNAを輸送することができる。

【0034】

非ウイルス遺伝子移入法としては、リン酸カルシウム共沈法 [Virology, 52, 456-467 (1973); Science, 209, 1414-1422 (1980)]、マイクロインジェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5399-5403 (1980); Proc. Natl. Acad.

. Sci. USA, 77, 7380-7384 (1980); Cell, 27, 223-231 (1981); Nature, 294, 92-94 (1981)]、リポソームを介した膜融合-介在移入法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413-7417 (1987); Biochemistry, 28, 9508-9514 (1989); J. Biol. Chem., 264, 12126-12129 (1989); Hum. Gene Ther., 3, 267-275 (1992); Science, 249, 1285-1288 (1990); Circulation, 83, 2007-2011 (1992)]、直接DNA取り込みまたは受容体-媒介DNA移入法 [Science, 247, 1465-1468 (1990); J. Biol. Chem., 266, 14338-14342 (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3655-3659 (1991); J. Biol. Chem., 264, 16985-16987 (1989); Bio Techniques, 11, 474-485 (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3410-3414 (1990); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4255-4259 (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 4033-4037 (1990); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 8850-8854 (1991); Hum. Gene Ther., 3, 147-154 (1991)]等をあげることができる。

【 0 0 3 5 】

リガンドのGPR4への結合を阻害する物質としては、例えば、GPR4を認識する抗体、GPR4に拮抗作用を有する化合物等をあげることができる。

上記抗体としては、GPR4を認識する抗体であればいずれも用いることができ、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよい。このような抗体として、例えば、GPR4を認識する中和抗体等をあげることができる。

【 0 0 3 6 】

上記抗体は、例えば、以下の方法に準じて調製することができる。

(1) ポリクローナル抗体の作製

GPR4またはその部分断片ポリペプチドの精製標品、あるいはGPR4の一部のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。

【 0 0 3 7 】

投与する動物としては、ウサギ、ヤギ、ラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。

該抗原の投与量は動物1匹当たり50~100 μ gが好ましい。

ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン (keyhole limpet haemocyanin) や牛チログロブリン等のキャリア蛋白に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。

【0038】

該抗原の投与は、1 回目の投与の後1～2週間おきに3～10回行う。各投与後、3～7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法 (ELISA法) : 医学書院刊 (1976年)、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)〕等で確認する。

【0039】

免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。

分離、精製する方法としては、遠心分離、40～50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿〔Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)〕、またはDEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独でまたは組み合わせて処理する方法が挙げられる。

【0040】

(2) モノクローナル抗体の作製

(a) 抗体産生細胞の調製

免疫に用いたGPR4またはその部分断片ポリペプチドの精製標品、あるいはGPR4の一部のアミノ酸配列を有するペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として供する。

【0041】

該抗体価を示したラットに抗原物質を最終投与した後3～7日目に、脾臓を摘出する。

該脾臓をMEM培地 (日水製薬社製) 中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200rp

mで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の脾細胞をトリス-塩化アンモニウム緩衝液 (pH7.65) で1~2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

【0042】

(b) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。例えば、8-アザグアニン耐性マウス (BALB/c由来) 骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1(以下、P3-U1と略す) [Curr. Topics Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Eur. J. Immunol., 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14(SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653) [J. Immunol., 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495 (1975)] 等を用いることができる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地 [RPMI-1640培地にグルタミン (1.5mmol/l)、2-メルカプトエタノール (5×10^{-5} mol/l)、ジェンタマイシン ($10 \mu\text{g/ml}$) および牛胎児血清 (FCS) (CSL社製、10%) を加えた培地 (以下、正常培地という) に、さらに8-アザグアニン ($15 \mu\text{g/ml}$) を加えた培地] で継代するが、細胞融合の3~4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を 2×10^7 個以上用いる。

【0043】

(c) ハイブリドーマの作製

(a) で取得した抗体産生細胞と (b) で取得した骨髓腫細胞をMEM培地またはPBS (リン酸二ナトリウム1.83g、リン酸一カリウム0.21g、食塩7.65g、蒸留水1リットル、pH7.2) でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞: 骨髓腫細胞=5~10:1になるよう混合し、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

【0044】

得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37℃で、 10^8 抗体産生細胞あたり、ポリエチレングリコール-1000 (PEG-1000) 2g、MEM 2mlおよびジメチルスルホキシド (DMSO) 0.7mlを混合した溶液を0.2~1ml添加し、さらに1~2分間毎にMEM培地1~2mlを数回添加する。

添加後、MEM培地を加えて全量が50mlになるように調製する。該調製液を900rp

mで5分間遠心分離後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかにHAT培地〔正常培地にヒポキサンチン (10^{-4} mol/l)、チミジン (1.5×10^{-5} mol/l) およびアミノプテリン (4×10^{-7} mol/l) を加えた培地〕100ml中に懸濁する。

【0045】

該懸濁液を96穴培養用プレートに100 μ l/穴ずつ分注し、5%CO₂インキュベーター中、37℃で7～14日間培養する。

培養後、培養上清の一部を取りアンチボディイズ〔Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)〕等に述べられている酵素免疫測定法により、本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

【0046】

酵素免疫測定法の具体例として、以下の方法をあげることができる。

免疫の際、抗原に用いたGPR4またはその部分断片ポリペプチドの精製標品、あるいはGPR4の一部のアミノ酸配列を有するペプチドを適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の(d)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットまたは抗マウスイムノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行い、抗原に用いたポリペプチドに特異的に反応するものを本発明で用いられるモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

【0047】

該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返し〔1回目は、HT培地（HAT培地からアミノプテリンを除いた培地）、2回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを本発明で用いられるモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株として選択する。

(d)モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理〔2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン (Pristane) 0.5mlを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8～10週令のマウスまたはヌードマウスに

、(c)で取得した本発明で用いられるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞 $5\sim 20\times 10^6$ 細胞／匹を腹腔内に注射する。10～21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。

【0048】

該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。

得られた上清より、ポリクローナル抗体で用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。ポリペプチド量は、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出する。

【0049】

上記、GPR4を認識する抗体を含有する喘息の予防および／または治療剤は以下のように調製することができる。

該抗体を有効成分として含有する医薬は、該有効成分を単独で投与することも可能ではあるが、通常は該有効成分を薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。好ましくは水、あるいは食塩、グリシン、グルコース、ヒトアルブミン等の水溶液等の水性担体に溶解した無菌的な溶液が用いられる。また、製剤溶液を生理的条件に近づけるための緩衝化剤や等張化剤のような、薬理学的に許容される添加剤、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化カリウム、クエン酸ナトリウム等を添加することもできる。また、凍結乾燥して貯蔵し、使用時に適当な溶媒に溶解させて用いることもできる。

【0050】

投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または静脈内投与等の非経口投与をあげることができる。投与形態としては、錠剤、注射剤等が挙げられる。

経口投与に適当な製剤としては、錠剤等が挙げられる。錠剤等は、乳糖、マン

ニトール等の賦形剤、デンプン等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム等の滑沢剤、ヒドロキシプロピルセルロース等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

【0051】

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤等が挙げられる。例えば、注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液または両者の混合物からなる担体等を用いて調製する。また、非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g/kg}$ ～ 8mg/kg である。

【0052】

GPR4の構成的活性により生じるシグナル伝達を抑制する物質は、該構成的活性により生ずるシグナル伝達を抑制することのできる物質を探索することによっても取得することができる。

GPR4に拮抗作用を有する化合物としては、例えば、式(I)で表される化合物が挙げられる。以下、式(I)で表される化合物を化合物(I)という。他の式番号の化合物についても同様である。

【0053】

化合物(I)の各基の定義において、以下の例示が挙げられる。

(i)低級アルキルとしては、例えば直鎖または分岐状の炭素数1～10のアルキルが挙げられ、具体的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、イソオクチル、ノニル、デシル等が挙げられる。

(ii)シクロアルキルとしては、例えば炭素数3～8のシクロアルキルが挙げられ、具体的にはシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル等が挙げられる。

【0054】

(iii)低級アルケニルとしては、例えば直鎖、分岐または環状の炭素数2～8の

アルケニルが挙げられ、具体的にはビニル、アリル、1-プロペニル、ブテニル、ペンテニル、ヘキセニル、ヘプテニル、オクテニル、シクロヘキセニル、2,6-オクタジエニル等が挙げられる。

(iv) 低級アルキニルとしては、例えば直鎖または分岐状の炭素数2～8のアルキニルが挙げられ、具体的にはエチニル、プロピニル、ブチニル、ペンチニル、ヘキシニル、ヘプチニル、オクチニル等が挙げられる。

(v) ハロゲンは、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素の各原子を表す。

【0055】

(vi) アリールおよびそれぞれが隣接する2つの炭素原子と一緒に形成される芳香環から水素原子を一つ除いた基としては、例えば炭素数6～14の単環性、二環性または三環式のアリールが挙げられ、具体的にはフェニル、ナフチル、インデニル、アントラニル等が挙げられる。

(vii) アラルキルおよび複素環アルキルのアルキレン部分は、前記の低級アルキル(i)の定義から水素原子を一つ除いたものと同義である。

(viii) アラルキルのアリール部分としては、前記アリール(vi)の定義で挙げた基に加え、例えば前記アリールがシクロアルキルと縮合した二環性縮合環基が挙げられ、具体的にはインダニル、1,2,3,4-テトラヒドロナフチル、6,7,8,9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプチル等が挙げられる。

【0056】

(ix) 複素環基および複素環アルキルの複素環基部分ならびにそれぞれが隣接する2つの炭素原子と一緒に形成される複素環から水素原子を一つ除いた基としては、例えば窒素原子、酸素原子および硫黄原子から選ばれる少なくとも1個の原子を含む5員または6員の単環性複素環基、3～8員の環が縮合した二環または三環式であって窒素原子、酸素原子および硫黄原子から選ばれる少なくとも1個の原子を含む縮環性複素環基等が挙げられ、具体的にはピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、ベンゾイミダゾリル、2-オキソベンゾイミダゾリル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾフリル、ベンゾチエニル、プリニル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾジオキサリル、インダゾリル、インドリル、イソインドリル、キノリル、イソキノリル、フタラジニル、ナフチル

リジニル、キノキサリニル、ピロリル、ピラゾリル、キナゾリニル、シンノリニル、トリアゾリル、テトラゾリル、イミダゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、チエニル、フリル、ピロリジニル、2, 5-ジオキソピロリジニル、チアゾリジニル、オキサゾリジニル、ピペリジル、ピペリジノ、ピペラジニル、ホモピペラジニル、ホモピペリジル、ホモピペリジノ、モルホリニル、モルホリノ、チオモルホリニル、チオモルホリノ、ピラニル、テトラヒドロピリジル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロキノリル、テトラヒドロイソキノリル、オクタヒドロキノリル、インドリニル等が挙げられる。

【0057】

(x)隣接する窒素原子と一緒に形成される複素環基としては、例えば少なくとも1個の窒素原子を含む5員または6員の単環性複素環基（該単環性複素環基は、他の窒素原子、酸素原子または硫黄原子を含んでいてもよい）、3～8員の環が縮合した二環または三環式で少なくとも1個の窒素原子を含む縮環性複素環基（該縮環性複素環基は、他の窒素原子、酸素原子または硫黄原子を含んでいてもよい）等が挙げられ、具体的にはピリジル、テトラヒドロピリジル、インドリニル、イソインドリニル、ピロリジニル、チアゾリジニル、オキサゾリジニル、ピペリジノ、ホモピペリジノ、ピペラジニル、ホモピペラジニル、モルホリノ、チオモルホリノ、ペルヒドロアゼピニル、ペルヒドロアゾシニル、テトラヒドロキノリル、テトラヒドロイソキノリル、オクタヒドロキノリル、ベンゾイミダゾリル、インダゾリル、インドリル、イソインドリル、プリニル、ジヒドロインドリル、ピロリル、ピラゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、イミダゾリル等が挙げられる。

【0058】

(xi)置換低級アルキルにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換基数1～3の、シクロアルキル、低級アルカノイル、低級アルコキシ、アリールオキシ、置換アリールオキシ〔該置換アリールオキシにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換基数1～3の、低級アルキル、低級アルコキシ、低級アルコキシカルボニル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボ

キシ、アミノ等が挙げられる。ここで低級アルキルは前記低級アルキル(i)と同義であり、ハロゲンハロゲン(v)と同義であり、低級アルコキシおよび低級アルコキシカルボニルの低級アルキル部分は前記低級アルキル(i)と同義である]、アラルキルオキシ、置換アラルキルオキシ [該置換アラルキルオキシにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換基数1~3の、低級アルキル、低級アルコキシ、低級アルコキシカルボニル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ等が挙げられる。ここで低級アルキルは前記低級アルキル(i)と同義であり、ハロゲンハロゲン(v)と同義であり、低級アルコキシおよび低級アルコキシカルボニルの低級アルキル部分は前記低級アルキル(i)と同義である]、低級アルカノイルオキシ、低級アルコキシカルボニル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、低級アルキルチオ、置換低級アルキル [該置換低級アルキルにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換基数1~3のヒドロキシ、ハロゲン等が挙げられる]、置換低級アルカノイル [該置換低級アルカノイルにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換基数1~3のハロゲン等が挙げられる]、モノまたはジ低級アルキルアミノ、低級アルキルスルホニル、低級アルキルスルフィニル、低級アルコキシカルボニルアミノ、低級アルカノイルアミノ、モノまたはジ低級アルキルアミノカルボニル、モノまたはジ低級アルキルアミノカルボニルオキシ等が挙げられる。

【0059】

ここで示したアリールオキシおよびアラルキルオキシのアリール部分、シクロアルキル、ハロゲン、ならびに低級アルカノイル、低級アルコキシ、低級アルカノイルオキシ、低級アルコキシカルボニル、低級アルキルチオ、低級アルキルスルホニル、低級アルキルスルフィニル、低級アルコキシカルボニルアミノおよび低級アルカノイルアミノの低級アルキル部分は、それぞれ前記アリール(vi)、シクロアルキル(ii)、ハロゲン(v)、および低級アルキル(i)と同義であり、アラルキルオキシのアルキレン部分は、前記低級アルキル(i)から水素原子を一つ除いたものと同義である。

【0060】

モノまたはジ低級アルキルアミノ、モノまたはジ低級アルキルアミノカルボニルおよびモノまたはジ低級アルキルアミノカルボニルオキシの低級アルキル部分は、それぞれ前記低級アルキル(i)と同義であり、ジ低級アルキルアミノ、ジ低級アルキルアミノカルボニルおよびジ低級アルキルアミノカルボニルオキシの2つの低級アルキル部分は、それぞれ同一でも異なってもよい。

【0061】

(xii)置換アリール、置換アラルキル、置換シクロアルキル、置換低級アルケニル、置換低級アルキニル、置換複素環基、置換複素環アルキル、隣接する窒素原子と一緒に形成される置換複素環基、それぞれが隣接する2つの炭素原子と一緒に形成される芳香環およびそれぞれが隣接する2つの炭素原子と一緒に形成される複素環における置換基としては、前記置換低級アルキルにおける置換基(xi)の定義で挙げた基に加え、アリール、置換アリール、アラルキル、置換アラルキル、複素環基、置換複素環基、複素環アルキル、置換複素環アルキル等が挙げられる。さらに、置換アリールおよび隣接する窒素原子と一緒に形成される置換複素環基における置換基は低級アルキル〔該低級アルキルは前記低級アルキル(i)と同義である〕または置換低級アルキル〔該低級アルキルは前記低級アルキル(i)と同義であり、該置換低級アルキルにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換基数1~3の、ハロゲン、ヒドロキシ、カルボキシ、低級アルコキシカルボニル等が挙げられる。ここでハロゲンは前記ハロゲン(v)と同義であり、低級アルコキシカルボニルの低級アルキル部分は前記低級アルキル(i)と同義である〕であってもよい。

【0062】

ここで示したアリール、複素環基および複素環アルキルの複素環基部分、アラルキルおよび複素環アルキルのアルキレン部分ならびにアラルキルのアリール部分は、それぞれ前記アリール(vi)、複素環基(ix)、アラルキルのアルキレン部分(vii)およびアラルキルのアリール部分(viii)と同義である。また、置換アリール、置換アラルキル、置換複素環基、置換複素環アルキルにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換基数1~3の、低級アルキル〔該低級アルキルは前記低級アルキル(i)と同義である〕、低級アルコキシ〔該低級アルコキ

シの低級アルキル部分は前記低級アルキル(i)と同義である]、ハロゲン [該ハロゲンは前記ハロゲン (v) と同義である] 等が挙げられる。

【0063】

化合物(I)の薬理学的に許容される塩としては、毒性のない、水溶性のものが好ましく、例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、硝酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、クエン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、リンゴ酸塩、シュウ酸塩、メタンスルホン酸塩、酒石酸塩等の有機酸塩等の酸付加塩、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、亜鉛塩等の金属塩、アンモニウム、テトラメチルアンモニウム等のアンモニウム塩、モルホリン付加塩、ピペリジン付加塩等の有機アミン付加塩、またはグリシン付加塩、フェニルアラニン付加塩、リジン付加塩、アスパラギン酸付加塩、グルタミン酸付加塩等のアミノ酸付加塩等が挙げられる。

【0064】

次に化合物(I)の製造法について説明する。

なお、以下に示した製造法において、定義した基が反応条件下変化するか、または方法を実施するのに不適切な場合、有機合成化学で常用される方法、例えば官能基の保護、脱保護等 [例えば、プロテクティブ・グループス・イン・オーガニック・シンセシス 第三版 (Protective Groups in Organic Synthesis, the third edition)、グリーン (T.W.Greene)、ワッツ (Peter G.M.Wuts) 著、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ・インコーポレイテッド (John Wiley & Sons Inc.) (1999年)] の手段に付すことにより容易に製造を実施することができる。また、必要に応じて置換基導入等の反応工程の順序を変えることもできる。

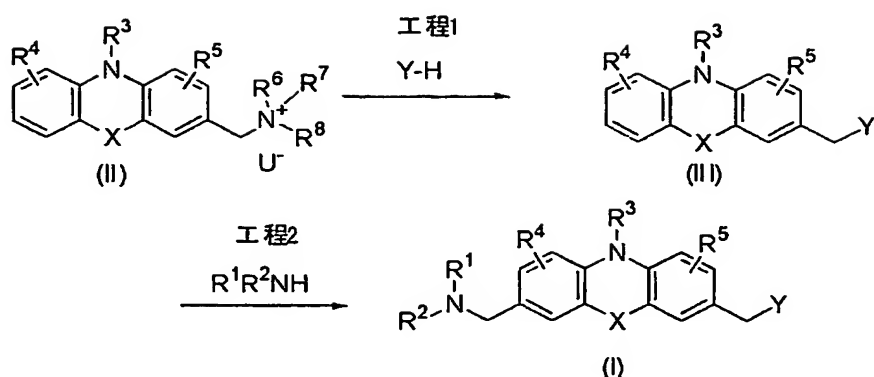
【0065】

化合物 (I) は、例えば以下に示す製造方法によって得ることができる。

製造法 1

【0066】

【化7】



【0067】

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 X および Y はそれぞれ前記と同義であり、 R^6 は低級アルキル、アリルまたはベンジルを表し、 R^7 および R^8 は同一または異なって低級アルキルまたはシクロアルキルを表すか、 R^7 および R^8 が隣接する窒素原子と一緒になって複素環基を形成し、 U はハロゲン、アルコキシスルホニルオキシ、アリールオキシスルホニルオキシ、アルキルスルホニルオキシまたはアリールスルホニルオキシを表す)

上記の定義において、低級アルキル、シクロアルキルおよびハロゲンはそれぞれ前記と同義である。アルコキシスルホニルオキシおよびアルキルスルホニルオキシのアルキル部分、アリールオキシスルホニルオキシおよびアリールスルホニルオキシのアリール部分は、それぞれ前記低級アルキル、アリールと同義である。隣接する窒素原子と一緒になって形成される複素環基は前記と同義である。

【0068】

<工程1>

化合物 (II) を原料として用い、特開平7-61983に開示された方法に従い、当量ないし大過剰の $Y-H$ (式中、 Y は前記と同義である) と反応させることにより、化合物 (III) を得ることができる。なお、化合物 (II) は特開平7-61983に開示された方法またはそれに準じた方法により合成することができる。

<工程 2>

化合物 (III) を溶媒中、1当量ないし大過剰のホルムアルデヒド水溶液存在下に、1当量ないし大過剰の R^1R^2NH (式中、 R^1 および R^2 はそれぞれ前記と同義である) またはその塩酸塩と反応させることにより、化合物 (I) を得ることができる。

【0069】

溶媒としては、例えば水、メタノール、エタノール、酢酸、トリフルオロ酢酸、ジクロロエタン、クロロホルム、テトラヒドロフラン、ジメチルアセトアミド、ジメチルホルムアミド、アセトン等が単独でまたは混合物として用いられ、好ましくはクロロホルムと酢酸の混合溶媒が用いられる。また、ホルムアルデヒド水溶液に代え、トリオキシメチレンまたはパラホルムアルデヒド等のホルムアルデヒド等価体を用いることもできる。反応は通常、酸性条件下で良好に進行するので、必要に応じて塩酸、酢酸、トリフルオロ酢酸等の酸を反応系内に添加するのが好ましい。

【0070】

反応は通常、0℃から溶媒の沸点の間の温度、好ましくは室温～80℃の間の温度で行い、5分間から100時間で終了する。

化合物 (I) および原料化合物における各官能基の変換および置換基に含まれる官能基の変換は、公知の方法 [例えば、コンプリヘンシブ・オーガニック・トランスフォーメーションズ 第二版 (Comprehensive Organic Transformations, the second edition)、R.C. ラロック (Larock) 著、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ・インコーポレーティッド (John Wiley & Sons Inc.) (1999年) に記載の方法] 等によって行うことができる。

【0071】

上記の方法等を適宜組み合わせることで実施することにより、所望の位置に所望の官能基を有する化合物 (I) を得ることができる。

上記製造法における中間体および生成物の単離・精製は、通常の有機合成で用いられる方法、例えば濾過、抽出、洗浄、乾燥、濃縮、結晶化、各種クロマトグラフィー等を適宜組み合わせることで行うことができる。さらに一般的な並列合成法で

常用される精製法、例えば、スカベンジャーレジン、イオン交換レジンを用いた精製法によっても行うことができる。また、中間体においては、特に精製することなく次の反応に供することもできる。

【0072】

化合物(I)には、位置異性体、幾何異性体、光学異性体または互変異性体のような異性体が存在し得るものもあるが、これらを含め可能な全ての異性体および該異性体のいかなる比率における混合物も本発明に包含される。

化合物(I)の塩を取得したい場合には、化合物(I)の塩が得られるときはそのまま精製すればよく、また化合物(I)が遊離の形で得られるときは化合物(I)を適当な溶媒に溶解または懸濁し、酸または塩基を加えて単離・精製すればよい。

【0073】

また、化合物(I)またはその薬理学的に許容される塩は、水または各種溶媒との付加物の形で存在することもあるが、これらの付加物も本発明に包含される。

以下、第1表(化合物1～4)～第7表に本発明の喘息の予防および／または治療剤として用いられる化合物(I)の具体例を示すが、本発明の喘息の予防および／または治療剤として用いられる化合物範囲はこれらの化合物に限定されることはない。

【0074】

【表 1】

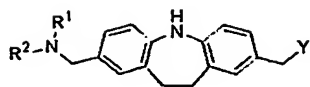
第1 表

化合物 番号	構造式
1	
2	
3	
4	
5	

【0075】

【表 2】

第2 表

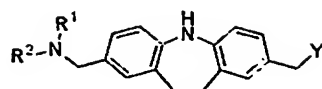


化合物 番号	$-NR^1R^2$	$-Y$	質量分析値
6			MS m/z 508 (M+H) ⁺
7			MS m/z 563 (M+H) ⁺
8			MS m/z 570 (M+H) ⁺
9			MS m/z 571 (M+H) ⁺
10			MS m/z 553 (M+H) ⁺
11			MS m/z 484 (M+H) ⁺
12			MS m/z 482 (M+H) ⁺
13			MS m/z 528 (M+H) ⁺

【0076】

【表 3】

第3 表

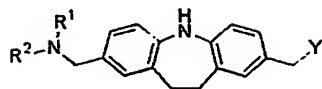


化合物 番号	-NR¹R²	-Y	質量分析値
14			MS m/z 438 (M+H) ⁺
15			MS m/z 421 (M+H) ⁺
16			MS m/z 409 (M+H) ⁺
17			MS m/z 451 (M+H) ⁺
18			MS m/z 506 (M+H) ⁺
19			MS m/z 513 (M+H) ⁺
20			MS m/z 514 (M+H) ⁺
21			MS m/z 496 (M+H) ⁺
22			MS m/z 425 (M+H) ⁺
23			MS m/z 427 (M+H) ⁺
24			MS m/z 425 (M+H) ⁺
25			MS m/z 471 (M+H) ⁺

【0077】

【表4】

第4表

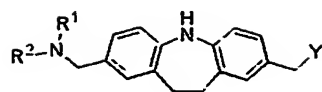


化合物 番号	-NR¹R²	-Y	質量分析値
26			MS m/z 514 (M+H)⁺
27			MS m/z 497 (M+H)⁺
28			MS m/z 485 (M+H)⁺
29			MS m/z 527 (M+H)⁺
30			MS m/z 582 (M+H)⁺
31			MS m/z 589 (M+H)⁺
32			MS m/z 590 (M+H)⁺
33			MS m/z 572 (M+H)⁺
34			MS m/z 501 (M+H)⁺
35			MS m/z 503 (M+H)⁺
36			MS m/z 501 (M+H)⁺
37			MS m/z 547 (M+H)⁺

【0078】

【表 5】

第5表

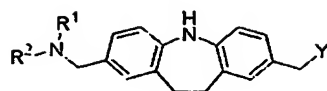


化合物 番号	$-NR^1R^2$	$-Y$	質量分析値
38			MS m/z 452 (M+H) ⁺
39			MS m/z 435 (M+H) ⁺
40			MS m/z 423 (M+H) ⁺
41			MS m/z 465 (M+H) ⁺
42			MS m/z 520 (M+H) ⁺
43			MS m/z 527 (M+H) ⁺
44			MS m/z 528 (M+H) ⁺
45			MS m/z 510 (M+H) ⁺
46			MS m/z 439 (M+H) ⁺
47			MS m/z 441 (M+H) ⁺
48			MS m/z 439 (M+H) ⁺
49			MS m/z 485 (M+H) ⁺

【0079】

【表6】

第6表

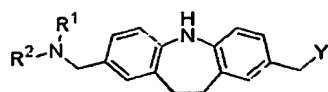


化合物 番号	-NR¹R²	-Y	質量分析値
50			MS m/z 466 (M+H)⁺
51			MS m/z 449 (M+H)⁺
52			MS m/z 437 (M+H)⁺
53			MS m/z 479 (M+H)⁺
54			MS m/z 534 (M+H)⁺
55			MS m/z 541 (M+H)⁺
56			MS m/z 542 (M+H)⁺
57			MS m/z 524 (M+H)⁺
58			MS m/z 453 (M+H)⁺
59			MS m/z 455 (M+H)⁺
60			MS m/z 453 (M+H)⁺
61			MS m/z 499 (M+H)⁺

【0080】

【表 7】

第7 表



化合物 番号	$-NR^1R^2$	$-Y$	質量分析値
62			MS m/z 466 (M+H) ⁺
63			MS m/z 449 (M+H) ⁺
64			MS m/z 437 (M+H) ⁺
65			MS m/z 479 (M+H) ⁺
66			MS m/z 534 (M+H) ⁺
67			MS m/z 541 (M+H) ⁺
68			MS m/z 542 (M+H) ⁺
69			MS m/z 524 (M+H) ⁺
70			MS m/z 453 (M+H) ⁺
71			MS m/z 455 (M+H) ⁺
72			MS m/z 453 (M+H) ⁺
73			MS m/z 499 (M+H) ⁺

【0081】

次に化合物の薬理作用について試験例で説明する。

試験例1: GPR4拮抗作用

参考例11で得られたGPR4のアッセイ細胞（該アッセイ細胞は 17β -エストラジオールの刺激によりGPR4を発現する）を白色プレートに1ウェル当たり 10^5 個播種し、反応液中10 nmol/Lになるように 17β -エストラジオール（ 17β -estradiol、シグマ社製）を培地で希釈したものと試験化合物を加え、 37°C 、5% CO_2 インキュベーター中で6時間反応させた。その後、Steady Glo Luciferase Assay System（Promega社製）溶液を加えて反応を停止し、トップカウント（Packard, Meriden, CT, USA）で1秒間の発光量を測定した。

【0082】

試験化合物の活性（拮抗作用）は、下の式に示す通り 17β -エストラジオール添加時と非添加時のカウント数（count per second）をもとに算出した阻害率で表した。 IC_{50} 値は、阻害率からLogit-Log変換法の線形近似解析法によって算出した。

式中、A、B、Cはそれぞれ以下の意味を表す。

A: 17β -エストラジオールおよび試験化合物を添加時のカウント数

B: 17β -エストラジオールおよび試験化合物の両方とも非添加時のカウント数

C: 17β -エストラジオールのみ添加時のカウント数

【0083】

【数1】

$$\text{阻害率 (\%)} = [1 - \{(A - B) / (C - B)\}] \times 100$$

【0084】

結果を第8表に示す。

【0085】

【表8】

第8表

化合物番号	IC ₅₀ (nmol/L)
1	86
2	3.2
3	3.6
4	5.8
5	54

【0086】

以上の結果より、化合物(I)が、GPR4に拮抗することが示された。

【0087】

試験例2：抗原誘発気道収縮に対する抑制作用

BALB/c雄性マウス(7週齢)に50 μ g卵白アルブミンおよび1 mg水酸化アルミニウムを生理食塩液(大塚生食注、大塚製薬)に混合させて得られた混合液を1週間の間隔をあけて2回腹腔内投与して感作し、最終感作14日後に1%卵白アルブミン生理食塩溶液または生理食塩液(陰性対照群)をそれぞれ30分間吸入させ抗原抗体反応を惹起した。メチルセルロースを0.5%含む溶液(溶媒)に化合物1を懸濁し、抗原吸入1時間前に100 mg/kgを経口投与、または5分前に30 mg/kgを腹腔内投与した。また、陽性対照群には試験化合物懸濁液の代わりに溶媒を投与した。気道収縮反応は抗原吸入直後から30分間の気道抵抗(penh)をマウス呼吸機能測定装置(BioSystem XA; Buxco Electronics, Inc., Sharon, CT, USA)で測定し、30分間の曲線下面積(AUC_{0-30min})を算出して評価した。試験是一群10匹で実施した。

【0088】

化合物 1 を腹腔内投与した場合の結果を図 1、経口投与した場合の結果を図 2 に示す。

図 1（腹腔内投与）に示すように、陽性対照群の気道反応の $AUC_{0-30min}$ (18.2 ± 1.02 , 平均±標準誤差)は陰性対照群の $AUC_{0-30min}$ (14.77 ± 0.27)と比べ有意に増加($P=0.0043$, student's t-test)した。化合物 1 腹腔内投与群の $AUC_{0-30min}$ は 14.60 ± 0.46 であり、陽性対照群と比べ、気道収縮反応を105%抑制した($P=0.0047$, student's t-test)。

【0089】

図 2（経口投与）に示すように、陽性対照群の気道収縮反応の $AUC_{0-30min}$ (19.61 ± 0.75 , 平均±標準誤差)は陰性対照群の $AUC_{0-30min}$ (13.37 ± 0.20)と比べ有意に増加($P<0.0001$, student's t-test)した。化合物 1 経口投与群の $AUC_{0-30min}$ は 16.85 ± 0.84 であり、陽性対照群と比べ、気道収縮反応を44%抑制した($P=0.0248$, student's t-test)。

【0090】

本発明に係る医薬は、式 (I) で表される含窒素三環式化合物およびその薬理的に許容される塩、ならびにそれらの水和物および溶媒和物からなる群から選ばれる物質を有効成分として含むことを特徴とする。本発明に係る医薬としては、有効成分である上記物質をそのまま投与してもよいが、一般的には、有効成分である上記の物質と 1 または 2 以上の製剤用添加物とを含む医薬組成物の形態で投与することが望ましい。このような医薬組成物は、それ自体製剤学の分野で周知または慣用の方法に従って製造することが可能である。また、医薬組成物の形態である本発明に係る医薬には、他の医薬の有効成分が1または2以上含まれていてもよい。なお、本発明の医薬は、ヒトを含む哺乳類動物に適用可能である。

【0091】

本発明の医薬の投与経路は特に限定されず、経口投与または静脈内投与等の非経口投与のいずれかから治療および／または予防のために最も効果的な投与経路を適宜選択することができる。経口投与に適する製剤の例としては、例えば、錠剤等を挙げることができ、非経口投与に適する製剤の例としては、例えば、注射剤等を挙げることができる。

【0092】

錠剤等の固形製剤の製造には、例えば、乳糖、マンニット等の賦形剤；デンプン等の崩壊剤；ステアリン酸マグネシウム等の滑沢剤；ヒドロキシプロピルセルロース等の結合剤；脂肪酸エステル等の界面活性剤；グリセリン等の可塑剤等を用いることができる。

非経口投与に適する製剤のうち注射剤等の血管内投与用製剤は、好ましくはヒト血液と等張の水性媒体を用いて調製することができる。例えば、注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、塩水とブドウ糖溶液の混合物等から選ばれる水性媒体を用い、常法に従って適当な助剤とともに溶液、懸濁液、または分散液として調製することができる。非経口用の製剤の製造には、例えば、希釈剤、香料、防腐剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、結合剤、界面活性剤、可塑剤等から選択される1または2以上の製剤用添加物を用いることもできる。

【0093】

本発明の医薬の投与量および投与頻度は特に限定されず、有効成分である上記物質の種類、投与経路、治療および／または予防の目的、患者の年齢および体重、症状の性質および重篤度等の種々の条件に応じて適宜選択することが可能である。例えば、成人1日当たり0.1～100mg/kgを3～4回に分けて投与するのが好ましい。しかしながら、これら投与量および投与回数は前述の種々の条件等により変動する。

【0094】

【実施例】

以下に、本発明を参考例および実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例等により限定されることはない。

下記参考例中の各化合物の物理化学的データは、以下の機器類によって測定した。

【0095】

^1H NMR: JEOL JNM-EX270 (270 MHz) または JEOL JNM-GX270 (270 MHz)

MS: Micromass LCT または Micromass Quattro (APCI法により測定)

【0096】

参考例 1 : 化合物 1 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-(4-メチルピペラジニルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

特開平7-61983に記載された2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン (30.0 g, 78.4 mmol) をクロロホルム (300 mL) と酢酸 (300 mL) の混合溶媒に溶解し、1-メチルピペラジン (23.6 g, 236 mmol) およびホルムアルデヒド (37 %水溶液、7.64 g, 94.1 mmol) を加え、60℃に加熱し、18時間撹拌した。反応の進行を薄層クロマトグラフィーで確認した後、氷冷下に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和重曹水、水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下で濃縮した。析出した結晶を酢酸エチルでトリチュレーションし、目的物である化合物 1 (27.4 g, 55.4 mmol, 収率71%) を得た。

【0097】

APCI-MS: m/z 495 ($[M + H]^+$)

^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 1.30 (t, $J = 7.6$ Hz, 3 H), 2.27 (s, 3 H), 2.45 (m, 8 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.79 (q, $J = 7.6$ Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 3.38 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.00 (s, 1 H), 6.57-6.66 (m, 2 H), 6.79-7.00 (m, 5 H).

また、対応するフマル酸塩を以下の方法に従って調製した。

【0098】

上記の化合物 1 (15 g) をメタノール (110 mL) に溶解し、フマル酸 7.0g (2.0 当量) を加えた。結晶の析出した懸濁液を一旦濃縮乾固し、アセトニトリル (100 mL) を加え懸濁液を1時間以上撹拌した。その後、結晶を濾取して、減圧下、乾燥することによりにより化合物 1 の2フマル酸塩を得た(20.1 g, 収率 91.2%)。

【0099】

参考例 2 : 化合物 2 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-(1,2,3,6-テトラヒドロピリジルメチル)-10,11

ージヒドロ-5H-ジベンゾ[b, f]アゼピン} の合成

1-メチルピペラジンの代わりに1,2,3,6-テトラヒドロピリジンを用い、参考例1と同様にして、特開平7-61983に記載された2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b, f]アゼピンから収率20%で化合物2を得た。

【0100】

APCI-MS: m/z 478 ([M + H]⁺)

¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.30 (t, J = 7.5 Hz, 3 H), 2.04 (m, 2 H), 2.53 (t, J = 5.7 Hz, 2 H), 2.60 (s, 3 H), 2.62 (s, 3 H), 2.79 (q, J = 7.5 Hz, 2 H), 2.86-3.02 (m, 6 H), 3.45 (s, 2 H), 5.33 (s, 2 H), 5.64 (m, 1 H), 5.74 (m, 1 H), 6.02 (s, 1 H), 6.57-6.70 (m, 2 H), 6.78-6.82 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 6.95-7.00 (m, 2 H).

【0101】

参考例3: 化合物3 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-ピロリジニルメチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b, f]アゼピン} の合成

1-メチルピペラジンの代わりにピロリジンを用い、参考例1と同様にして、特開平7-61983に記載された2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b, f]アゼピンから収率20%で化合物3を得た。

【0102】

APCI-MS: m/z 466 ([M + H]⁺)

¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.30 (t, J = 7.5 Hz, 3 H), 1.78 (m, 4 H), 2.50 (m, 4 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.79 (q, J = 7.5 Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 3.50 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.02 (s, 1 H), 6.58-6.66 (m, 2 H), 6.79-6.81 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 6.98-7.02 (m, 2 H).

【0103】

参考例4: 化合物4 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-モルホリノメチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベン

ゾ[b, f]アゼピン} の合成

1-メチルピペラジンの代わりにモルホリンを用い、参考例1と同様にして、特開平7-61983に記載された2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b, f]アゼピンから収率46%で化合物4を得た。

【0104】

APCI-MS: m/z 482 ($[M + H]^+$).

^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 1.30 (t, $J = 7.5$ Hz, 3 H), 2.43 (m, 4 H), 2.60 (m, 3 H), 2.63 (m, 3 H), 2.79 (q, $J = 7.5$ Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 3.38 (s, 2 H), 3.69 (m, 4 H), 5.34 (s, 2 H), 6.07 (s, 1 H), 6.58-6.67 (m, 2 H), 6.78-6.81 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 6.96-7.01 (m, 2 H).

【0105】

参考例5: 化合物6~化合物13の合成

特開平7-61983に記載された2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b, f]アゼピン (19 mg, 0.050 mmol) をクロロホルム (0.30 mL) と酢酸 (0.30 mL) の混合溶媒に溶解し、対応する $\text{R}^1\text{R}^2\text{NH}$ のクロロホルム溶液 (1.0 mol/L, 0.15 mL) およびホルムアルデヒド (37 %水溶液、0.005 mL) を加え、60℃に加熱し、20時間攪拌した。反応の進行を薄層クロマトグラフィーで確認した後、溶媒を留去し、残渣をクロロホルムに溶解させ、水洗を2回施した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、濃縮し、残渣にクロロホルム (0.50 mL) およびN-メチルイサト酸無水物 ポリスチレン (N-Methylisatoic anhydride polystyrene、ノババイオケム社製、0.15 mL) を加え、室温で終夜攪拌した。反応混合物中のレジンを濾別し、残渣をイオン交換クロマトグラフィー (ボンデシルSCX、バリアン社製、2 mol/Lアンモニア-メタノール溶液で溶出) で精製し、目的物である化合物6~化合物13を得た。

【0106】

化合物の構造と質量分析値 (APCI-MS) を第2表に記した。

【0107】

参考例 6 : 化合物 14 ~ 化合物 73 の合成

工程 1

ヨウ化 1- (10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル) -1-メチルピペリジニウム (15 mg, 0.050 mmol) をジメチルホルムアミド (0.50 mL) に溶解し、対応するY-Hのクロロホルム溶液 (1.0 mmol/L, 0.060 mL) および水酸化リチウム (1水和物、70 mg) を加え、室温で20時間撹拌した。反応の進行を薄層クロマトグラフィーで確認した後、溶媒を留去し、残渣をジクロロメタンに溶解させ、水洗を3回施した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、濃縮し、残渣にクロロホルム (0.60 mL) およびN-メチルイサト酸無水物 ポリスチレン (N-Methylisatoic anhydride polystyrene、ノババイオケム社製、0.15 mL) を加え、室温で終夜撹拌した。反応混合物中のレジンを選択し、残渣をイオン交換クロマトグラフィー (ボンデシルSCX、バリアン社製、2 mol/Lアンモニアメタノール溶液で溶出) で精製し、製造法 1 における化合物 (III) に相当する各種中間体を得た。

工程 2

参考例 5 に示した方法と同様にして、工程 1 で得られた化合物 (III) に相当する各種中間体から、目的物である化合物 14 ~ 化合物 73 を得た。

【0108】

化合物の構造と質量分析値 (APCI-MS) を第 3 表 ~ 第 7 表に記した。

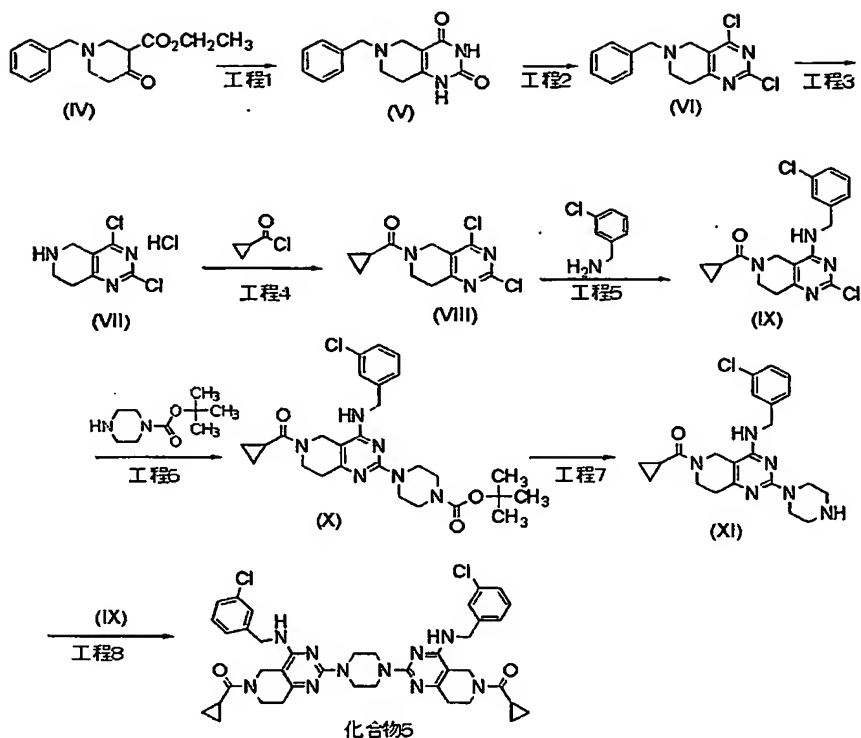
【0109】

参考例 7 : 化合物 5 {1,4-ビス[4-(3-クロロベンジルアミノ)-6-シクロプロピルカルボニル-5,6,7,8-テトラヒドロピリド[4,3-d]ピリミジン-2-イル]ピペラジン} の合成

化合物 5 は、以下の工程 1 ~ 工程 8 に従って合成した。

【0110】

【化8】



【0111】

工程1

市販の化合物 (IV) (100 g, 0.335 mol) をエタノール (1,500 mL) に溶解し、尿素 (100 g, 1.67 mol) およびナトリウムメトキシド (227 g, 1.18 mol) を加え、加熱還流条件下、24時間反応を行った。薄層クロマトグラフィーで反応の進行を確認し、冷却後、析出した結晶を濾取した。この結晶を水に懸濁させ、その中へ塩酸 (6 mol/L) を加え、pH6.0に調整した。さらに1時間室温で攪拌し、析出した結晶を濾取し、減圧下で乾燥させ、化合物 (V) (60 g, 収率70%) を得た。

工程2

工程1で得られた化合物 (V) (30.0 g, 0.116 mol) にオキシ塩化リン (300 mL) を加え、加熱条件下で5時間攪拌した。薄層クロマトグラフィーで反応の進

行を確認後、減圧下で過剰のオキシ塩化リンを留去した。その後、残渣に2-ブ
ロパノール (300 mL) を加え、析出した結晶を含む懸濁液を加熱還流条件下、1
時間攪拌し、さらに室温で1時間攪拌した。析出した結晶を濾取し、減圧下で乾
燥させ、化合物 (VI) (33 g, 収率85%) を得た。

【0112】

工程 3

工程 2 で得られた化合物 (VI) (35.0 g, 0.106 mol) を1,2-ジクロロエタン
(850 mL) に溶解し、そこへトリエチルアミン (14.9 mL, 0.107 mol) およびク
ロロ蟻酸 1-クロロエチル (34.1 mL, 0.316 mol) を加え、加熱還流条件下、5
時間攪拌した。薄層クロマトグラフィーで反応の進行を確認後、反応混合物を冷
却し、水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。得られ
た溶液を濃縮し、残渣をカラムクロマトグラフィー (シリカゲル、n-ヘキサン
: 酢酸エチル=3:1) で精製した。生成物をメタノール (850 mL) に溶解し、加
熱還流条件下、1時間攪拌した。薄層クロマトグラフィーで反応の進行を確認し
た後、濃縮乾固させることにより、化合物 (VII) (23.5 g, 収率95%) を得た。

工程 4

工程 3 で得られた化合物 (VII) (11.8 g, 49.1 mmol) をジクロロメタン (30
0 mL) に溶解し、シクロプロパンカルボニルクロリド (5.4 mL, 1.2当量) とト
リエチルアミン (20.4 mL, 3.0当量) を加え、室温で1時間攪拌した。得られた
反応溶液を水、飽和重曹水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去
した後、残渣にジイソプロピルエーテルを加え、懸濁液を1時間以上攪拌した。
その後、析出した結晶を濾取し、減圧下で乾燥させることにより、化合物 (VIII
) (12.5g, 収率 94%) を得た。

【0113】

工程 5

工程 4 で得られた化合物 (VIII) (12.5g, 45.9 mmol) をテトラヒドロフラン
(400 mL) に溶解し、トリエチルアミン (19.2 mL, 3当量) および3-クロロベ
ンジルアミン (11.2 mL, 2当量) を加えた後、40℃で20時間攪拌した。析出した
塩を濾過により除去後、溶媒を留去した。残渣をクロマトグラフィー (クロロホ

ルム：メタノール＝100：1 → 40：1）で精製し、目的物を含む画分の濃縮残渣にヘキサン／酢酸エチル混合溶媒（3:1）を加え、結晶を析出させた。結晶を含む懸濁液を1時間攪拌後、析出した結晶を濾取し、減圧下で乾燥させ、化合物（IX）（11.9g, 収率 69%）を得た。

工程 6

工程 5 で得られた化合物（IX）（5.0g, 13.3 mmol）をジオキサン（100 mL）に溶解し、tert-ブチル 1-ピペラジンカルボキシレート（4.9g, 2当量）と炭酸ナトリウム（14.0g, 10当量）を加え、90℃で3日間攪拌した。得られた反応溶液を濾過し、炭酸ナトリウムを除去後、濾液に水およびクロロホルムを加えて抽出を行い、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去した後、残渣にヘキサン／酢酸エチル混合溶媒（3:1）を加え、懸濁液を1時間攪拌した。その後、析出した結晶を濾取し、減圧下で乾燥させ、化合物（X）（6.4g, 収率 92%）を得た。

【0114】

工程 7

工程 6 で得られた化合物（X）（6.3g, 12.0 mmol）に20%トリフルオロ酢酸のジクロロメタン溶液（50 mL）を加え、室温で一時間攪拌した。反応溶液から溶媒を留去した後、残渣にジイソプロピルエーテルを加え、生成した懸濁液を1時間攪拌した。その後、析出した結晶を濾取し、減圧下で乾燥させ、化合物（XI）を得た（4.9 g, 収率 97%）。

工程 8

工程 7 で得られた化合物（XI）（3.8 g, 8.90 mmol）と、工程 5 で得られた化合物（IX）（4.5g, 1.05当量）をジオキサン（100 mL）に溶解し、炭酸ナトリウム（10.6g, 10当量）を加え、90℃で1週間攪拌した。得られた反応溶液を濾過し、炭酸ナトリウムを除去後、濾液に水を加えクロロホルムで抽出した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した後、残渣をカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：トリエチルアミン＝10：1）で精製した。目的物を含む画分の濃縮残渣にヘキサン／酢酸エチル混合溶媒（3:1）を加え、生成した懸濁液を1時間攪拌した。その後、析出した結晶を濾取し、減圧下で乾燥させることにより、化合

物5を得た(1.0g, 収率 23%)。

【0115】

APCI-MS: m/z 767 ($[M + H]^+$)

^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 0.7-0.9 (m, 4 H), 1.0-1.1 (m, 4 H), 1.7-1.9 (m, 2 H), 2.6-2.8 (m, 4 H), 3.75 (s, 8 H), 3.8-4.0 (m, 4 H), 4.3-4.4 (m, 4 H), 4.6-4.7 (m, 4 H), 4.8-4.9 (m, 2 H), 7.1-7.3 (m, 8 H).

【0116】

参考例8: 宿主・ベクター系の構築

(1) Gal4-ER発現プラスミドpGERbsrR2の造成

pSV2bsr(科研製薬社製)をPvuIIとEcoRIで切断後、Klenow処理して2.6kbのPvuII (平滑末端) -EcoRI (平滑末端) 断片を取得した。

【0117】

Gal4-ERキメラ遺伝子 [セル (Cell)、54巻、199頁 (1988年)、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステーツ・オブ・アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、90巻、1657頁 (1993年)] を含有するER α AF2 in pM (東京大学の加藤茂明先生より分与) をAatIIとNdeIで切断後、Klenow処理して、AatII (平滑末端) -NdeI (平滑末端) 断片を取得した。

【0118】

上記のpSV2bsr由来のPvuII (平滑末端) -EcoRI (平滑末端) 断片、およびER α AF2 in pM由来のAatII (平滑末端) -NdeI (平滑末端) 断片を結合することにより、プラスミドpGERbsrR2を造成した。pGERbsrR2は、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来の転写因子Gal4pのDNA結合領域とエストロゲン受容体のリガンド結合領域のキメラ蛋白質 (Gal4-ER) を発現することができる。

(2) ホタル・ルシフェラーゼの誘導発現プラスミドの造成

pcDNA3(インビトロジェン社)をXhoIで切断後、Klenow処理して、XhoI (平滑末端) 断片を取得した。該断片を結合することにより、XhoI切断部位を消失させたpcDNA3を造成した。XhoI切断部位を消失させたpcDNA3をKpnIで切断後、Klenow処理して、KpnI (平滑末端) 断片を取得した。該断片を結合することにより、XhoI

およびKpnI切断部位を消失させたpcDNA3を造成した。該プラスミドをBglIIで切断後、Klenow処理し、BglII（平滑末端）断片を取得した。

【0 1 1 9】

pAMoERC3Sc（特開平05-336963）をXhoIとNsiIで切断後、Klenow処理し、oriP配列を含む2.2kbのXhoI（平滑末端）-NsiI（平滑末端）断片を取得した。

上記のXhoI切断部位とKpnI切断部位を消失させたpcDNA3由来のBglII（平滑末端）断片、およびpAMoERC3Sc由来のXhoI（平滑末端）-NsiI（平滑末端）断片を結合することにより、プラスミドpcDNA3-oriPを造成した。pcDNA3-oriPをXhoIとHindIIIで切断し、XhoI-HindIII断片を取得した。

【0 1 2 0】

pSE01uc2（W098/14474）をXhoIとNcoIで切断後、Klenow処理して、アンピシリン耐性遺伝子を含むXhoI（平滑末端）-NcoI（平滑末端）断片を取得した。該断片を結合することにより、プラスミドpASd1-luc1を造成した。pASd1-luc1をXhoIとHindIIIで切断後、0.11kbのXhoI-HindIII断片を取得した。

上記pcDNA3-oriP由来のXhoI-HindIII断片、およびpASd1-luc1由来のXhoI-HindIII断片を結合し、プラスミドpcDNA3-oriP-Sd1を造成した。pcDNA3-oriP-Sd1をXhoIとKpnIで切断し、XhoI-KpnI断片を取得した。

【0 1 2 1】

配列番号1、2、3、および4で表される塩基配列を有する4種のDNAをDNA合成機で合成した。該合成DNAは混合してアニールすることによりポリA付加シグナルをもつ2本鎖DNAを形成する。該合成DNAをそれぞれT4 polynucleotide kinaseを用いてリン酸化後、混合してアニールさせることにより、二本鎖DNAとした。

該二本鎖DNAとpcDNA3-oriP-Sd1由来のXhoI-KpnI断片を結合することにより、プラスミドpcDNA3-oriP-Sd1-pAを造成した。pcDNA3-oriP-Sd1-pAをXhoIで切断後、Klenow処理して、XhoI（平滑末端）断片を取得した。

【0 1 2 2】

pFR-luc（ストラタジーン社製）をHindIIIとBamHIで切断後、Klenow処理し、0.14kbのHindIII（平滑末端）-BamHI（平滑末端）断片を取得した。

上記のpcDNA3-oriP-Sd1-pA由来のXhoI（平滑末端）断片、およびpFR-luc由

来のHindIII-BamHI断片を結合し、プラスミドpAGalSd1を作製した。pAGalSd1は、Gal4p応答配列 (UASG) を 5 回繰り返した配列を有するプロモーターを含有している。pAGalSd1をEcoRIで切断後、Klenow処理し、EcoRI (平滑末端) 断片を取得した。

【 0 1 2 3 】

pSE0luc2 (W098/14474) をHindIIIとSacIで切断後、Klenow処理することにより、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を含む1.7kbのHindIII (平滑末端) -SacI (平滑末端) 断片を取得した。

上記のpSE0luc2由来のHindIII (平滑末端) -SacI (平滑末端) 断片、およびpAGalSd1由来のEcoRI (平滑末端) 断片を結合することにより、プラスミドpAGalSd1-lucを造成した。

【 0 1 2 4 】

pAGalSd1-luc内に存在する二つのHindIIIサイトのうち、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子からより離れたHindIIIサイトのみをKlenow処理により消失させることにより、pAGalSd4-lucを造成した。

pAGalSd4-lucをAsp718で切断後、StuIで部分消化しpAGalSd4-luc由来の9.5kbのAsp718-StuI断片を取得した。該DNA断片をKlenow処理し、自己結合させることによりプラスミドpAGal9-lucを造成した。

(3) 誘導発現ベクターpAGal9-dおよびpAGal9-ndの造成

エプスタイン・バー・ウイルスのoriPを有する発現プラスミドpAGal9-lucをHindIIIとSacIで切断し、oriPを含む6.9kbのHindIII-SacI断片を取得した。

【 0 1 2 5 】

pAMo-d (特開2001-211885) をHindIIIとSacIで切断し、テトラサイクリン耐性遺伝子 (Tc^R) を含むHindIII-SacI断片を取得した。

上記のpAGal9-luc由来のHindIII-SacI断片、およびpAMo-d由来のHindIII-SacI断片を結合することにより、pAGal9-luc中のホタル・ルシフェラーゼ遺伝子部分をpAMo-dのStuffer配列と置き換えたプラスミドpAGal9-dを造成した。pAGal9-lucをHindIIIとSacIで切断し、6.9kbのHindIII-SacI断片を取得した。

【 0 1 2 6 】

pAMo-nd (特開2001-211885) をHindIIIとSacIで切断し、テトラサイクリン耐性遺伝子を含むHindIII-SacI断片を取得した。

上記のpAGal9-luc由来のHindIII-SacI断片、およびpAMo-nd由来のHindIII-SacI断片を結合することにより、pAGal9-luc中のホタル・ルシフェラーゼ遺伝子部分をpAMo-ndのStuffer配列と置き換えたプラスミドpAGal9-ndを造成した。

(4) Gal4-ER発現プラスミドpGERbsrR2をNamalwa KJM-1細胞の染色体DNAに組み込んだ細胞株KJMGER8の造成

Gal4-ERキメラ転写因子発現プラスミドpGERbsrR2を、 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるようにTE緩衝液 [10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)、1 mmol/L エチレンジアミン 4 酢酸] に溶解した後、エレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology)、3巻、133頁 (1990年)] により、該プラスミドをNamalwa KJM-1細胞 [サイトテクノロジー (Cytotechnology)、1巻、151頁 (1988年)] に、 6×10^6 細胞あたり $4\mu\text{g}$ 導入し、形質転換細胞を得た。Namalwa KJM-1細胞は、EBNA-1遺伝子を発現する無血清馴化したB細胞株である。

【0127】

該形質転換細胞を、8mlのRPMI1640・ITPSG培地 [RPMI1640培地 (日水製薬社製) に、1/40量の7.5% NaHCO_3 、3% 200mmol/L L-グルタミン溶液 (インビトロジェン社製)、0.5% ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 (インビトロジェン社製、5,000units/ml ペニシリン、5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン)、10mmol/L N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸 (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; HEPES)、3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ インシュリン、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トランスフェリン、5 mmol/L ピルビン酸ナトリウム、125 nmol/L 亜セレン酸ナトリウム、1 mg/ml ガラクトースを添加した培地] に懸濁し、 CO_2 インキュベーター中で37℃で24時間培養した。

【0128】

培養後、ブラストサイジン S (Blasticidin S) (KK-400: 科研製薬社製) を2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、96穴プレートに分注 (500~2000細胞/穴) して培養を行い、pGERbsrR2が染色体DNAに組み込まれた安定形質転換株 (シングルクローン) を多数取得した。各形質転換株は、2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のブラストサイジン S

を含むRPMI1640・ITPSG培地で継代した。

【0129】

下記に示す方法により上記安定形質転換株から、誘導倍率が高く、かつ非誘導時のバックグラウンドが低い優れた安定形質転換株KJMG8細胞を選択した。

各形質転換株にホタル・ルシフェラーゼの誘導発現プラスミドpAGalSdl-lucをエレクトロポレーション法により導入し、2日間培養した。

培養後、 17β -エストラジオール(E8875:シグマ社製)(終濃度10nmol/L)を添加し、さらに24時間培養後、ホタル・ルシフェラーゼ活性の測定を行った。活性の測定には、ルミノメーターLB953(ベルトールド社製)を用い、細胞溶解用緩衝液[1%トリトンX-100、100 mmol/L KH_2PO_4 (pH7.8)、1 mmol/Lジチオスレイトール] 100 μ lを、上記培養液に自動注入後、基質溶液[25 mmol/L グリシルグリシン (pH7.8)、15 mmol/L MgSO_4 、5 mmol/L ATP、0.33 mmol/L ルシフェリン] 300 μ lを自動注入し、10秒間の発光量を測定し、ルシフェラーゼ活性とした。比較のために、 17β -エストラジオール無添加条件下でのルシフェラーゼ活性も測定した。

【0130】

17β -エストラジオール添加条件下でのルシフェラーゼ活性と 17β -エストラジオール無添加条件下でのルシフェラーゼ活性を比較することにより、遺伝子発現の誘導倍率を算出し、該誘導倍率が高く、かつ 17β -エストラジオール無添加条件下のルシフェラーゼ活性が低いクローンとして、KJMG8細胞を選択した。

【0131】

参考例9:ホタル・ルシフェラーゼをレポーターとするレポータープラスミドpACREplucの造成

cAMP応答配列(CRE)の制御下にホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を発現することのできるレポータープラスミドであるpACREplucを以下の方法で造成した。pACREplucは、ハイグロマイシン耐性遺伝子およびエプスタイン・バー・ウィルスのoriPを有している。

【0132】

pAMo [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)

、268巻、22782頁（1993年）、別名pAMoPRC3Sc（特開平5-336963）] をClaIで部分消化し、一カ所切断されたDNA断片を取得した。該DNA断片をMluIで部分消化し、9.5kbのClaI-MluI断片を取得した。pAGE248 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)、269巻、14730頁（1994年）] をClaIおよびMluIで切断し、ハイグロマイシン耐性遺伝子を含む1.5kbのClaI-MluI断片を取得した。pAMo由来のClaI-MluI断片、およびpAGE248由来のClaI-MluI断片を結合し、プラスミドpAMohを造成した。

【 0 1 3 3 】

pAMohをXhoIとHindIIIで切断後、ハイグロマイシン耐性遺伝子を含むXhoI-HindIII断片を取得した。pAGal9-lucをSalIとHindIIIで切断し、oriP、Gal4UASを含むSalI-HindIII断片を取得した。pAGal9-luc由来のSalI-HindIII断片、および上記pAMoh由来のXhoI-HindIII断片を結合することにより、プラスミドpAGa19hを造成した。

【 0 1 3 4 】

pBluescriptII KS+（東洋紡績社製）をSalIおよびXhoIで切断した後、ホスファターゼ（Alkaline Phosphatase E.coli C75、宝酒造社製）を用いて脱リン酸化処理し、アンピシリン耐性遺伝子を含むSalI-XhoI断片を取得した。配列番号5および6で表される塩基配列を有する合成オリゴヌクレオチドをアニールさせることにより、CRE配列を2つ含む二本鎖DNAを調製した。該二本鎖DNAとpBluescriptII KS+由来の上記SalI-XhoI断片を結合し、CRE配列を2つ含むプラスミドpBS-CREIを造成した。pBS-CREIは、該二本鎖DNAが、SalI切断部位およびXhoI切断部位が再生する方向に組み込まれたプラスミドであり、上記切断部位をそれぞれ1つ有している。

【 0 1 3 5 】

pBS-CREIをScaIおよびXhoIで切断しファージflのoriを含むScaI-XhoI断片を取得した。pBS-CREIをScaIおよびSalIで切断しColE1 oriを含むScaI-SalI断片を取得した。pBS-CREI由来のScaI-XhoI断片およびScaI-SalI断片を結合し、CRE配列を4つ含むpBS-CREIIを造成した。

pBS-CREIIをScaIおよびXhoIで切断しファージflのoriを含むScaI-XhoI断片を

取得した。pBS-CREIIをScaIおよびSalIで切断しColEI oriを含むScaI-SalI断片を取得した。pBS-CREII由来のScaI-XhoI断片およびScaI-SalI断片を結合し、CRE配列を8つ含むpBS-CREIVを造成した。

【 0 1 3 6 】

pBS-CREIVをScaIおよびXhoIで切断しファージflのoriを含むScaI-XhoI断片を取得した。pBS-CREIVをScaIおよびSalIで切断しColEI oriを含むScaI-SalI断片を取得した。pBS-CREIV由来のScaI-XhoI断片およびScaI-SalI断片を結合し、CRE配列を16含むpBS-CREVIIIを造成した。

pBS-CREVIIIをXhoIで切断後、Klenow処理し、さらにHindIIIで切断することにより、16個のCREを含むHindIII-XhoI（平滑末端）断片を取得した。pAGalSdIをMluIとHindIIIで切断し、1.4kbのMluI-HindIII断片を取得した。pAGal9hをXbaIで切断後、Klenow処理し、さらにMluIで切断することによりXbaI（平滑末端）-MluI断片を取得した。pBS-CREVIII由来のHindIII-XhoI（平滑末端）断片、pAGalSdI由来のMluI-HindIII断片、およびpAGal9h由来のXbaI（平滑末端）-MluI断片を結合し、プラスミドpACREhを造成した。

【 0 1 3 7 】

pAGal9-lucをXhoIとNotIで切断し、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を含むXhoI-NotI断片を取得した。pACREhをXhoIとNotIで切断し、CRE配列を含むXhoI-NotI断片を取得した。pAGal9-luc由来のXhoI-NotI断片、およびpACREh由来のXhoI-NotI断片を結合することによりプラスミドpACRElucを造成した。

pACRElucをHindIIIで切断後、Klenow処理し、さらにXhoIで切断することによりCREを含むHindIII（平滑末端）-XhoI断片、およびホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を含むHindIII（平滑末端）-XhoI断片をそれぞれ取得した。pACREluc由来の上記2種のHindIII（平滑末端）-XhoI断片を結合することにより、pACREluc中のCRE配列上流のHindIIIサイトが消失したプラスミドpACRElucHを造成した。

【 0 1 3 8 】

pGL3-Enhancer vector [プロメガ(Promega)社製] をHindIIIとHpaIで切断し、luc+遺伝子（改変型のホタル・ルシフェラーゼ遺伝子）を含むHindIII-HpaI断片を取得した。pACRElucHをNotIで切断後、Klenow処理し、さらにHindIIIで切断

することにより、CREを含むHindIII-NotI（平滑末端）断片を取得した。pGL3-Enhancer vector由来のHindIII-HpaI断片、およびpACRElucH由来のHindIII-NotI（平滑末端）断片を結合することによりプラスミドpACRElucを造成した。

【 0 1 3 9 】

参考例 1 0 : GPR4誘導発現プラスミドの造成

ヒト肺由来のmRNA（クロンテック社製）を1 μ g用い、SUPERScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR（ギブコ社製）により一本鎖cDNAを合成した。該一本鎖cDNAを水で250倍希釈した溶液5 μ lを鋳型として、配列番号7および8に示した配列を有する合成DNAをGPR4遺伝子特異的プライマーとして用い、PCRによりGPR4 cDNAを取得した。GPR4遺伝子特異的プライマーの配列は、GPR4遺伝子の配列情報（GenBank受入番号：U21051）に基いて設計した。酵素としては、Pfu Turbo DNA Polymerase（Stratagene社製）を用いた。PCRを行う際の緩衝液としては、使用する酵素に付加された10倍濃度の緩衝液を使用した。PCRは、サーマルサイクラーDNA engine（MJ Research社製）を用い、95℃で5分間の処理後、94℃で1分間、60℃で1分間、72℃で1分間からなる反応を30サイクル行うことにより実施した。

【 0 1 4 0 】

増幅されたGPR4 cDNA断片をプライマー上に設計された配列を切断するHindIIIおよびNot Iで切断した。GPR4 cDNAを含む断片をアガロースゲル電気泳動法により回収した。

該切断断片を、プラスミドpAGal9-ndのHindIII-Not I 間へ組み込むことにより、GPR4誘導発現プラスミドpAGal9-GPR4を構築した。

【 0 1 4 1 】

pAGal9-nd中の配列に特異的なプライマー（配列番号9および10に示した配列を有する合成DNA）を用いて、該cDNAの5'側および3'側の配列を決定した。決定された配列に特異的な合成DNAを調製し、それをプライマーとして用い、さらに先の塩基配列を決定した。該操作を繰り返すことにより、該cDNAの全塩基配列を決定しGPR4をコードしていることを確認した。塩基配列の決定には、パーキン・エルマー社のDNAシーケンサー377と反応キット（ABI Prism™ BigDye™ Termina

tor Cycle Sequencing Ready Reaction kit:アプライド・バイオシステムズ社)を使用した。

【0142】

プラスミドに組み込んだDNA断片の配列を決定し、GPR4をコードしていることを確認した。

【0143】

参考例 11: GPR4のアッセイ細胞の構築

GPR4誘導発現プラスミドpAGal9-GPR4 (2 μ g) およびレポータープラスミドpACREpluc (2 μ g) を、上記エレクトロポレーション法により、 6×10^6 細胞のKJMGER8に共導入した。該形質転換株を8mlのRPMI1640・ITPSG培地に懸濁し、CO₂インキュベーター中、37℃で24時間培養した。培養後、ブラストサイジンS (2.0 μ g/ml)、ハイグロマイシンB (300 μ g/ml) およびジェネティシン (500 μ g/ml) を添加し、さらに14日間培養して安定形質転換株 (GPR4アッセイ細胞と呼ぶ) を取得した。該形質転換株を、ブラストサイジンS (2.0 μ g/ml)、ハイグロマイシンB (300 μ g/ml) およびジェネティシン (500 μ g/ml) を含むRPMI1640・ITPSG培地で継代した。

【0144】

同様にして、コントロールプラスミドpAGal9-nd (2 μ g) およびレポータープラスミドpACREpluc (2 μ g) をKJMGER8に共導入し、安定形質転換株 (コントロール細胞と呼ぶ) を取得した。

【0145】

参考例 12: マウス由来のヒトGPR4ホモログをコードするDNAのクローニング

ヒトGPR4遺伝子の塩基配列情報[Accession(AC) No.U21051]を基に、NCBIのデータベースを対象として検索を行った。その結果、相同性の高い配列として、マウスゲノム配列(AC073784)および複数のExpression sequence tag(EST)配列(BF178464、AA968193、AA798732、AI840893、AI851037)が選択された。該マウスゲノム配列とESTから構築された遺伝子の塩基配列を配列番号14に、該遺伝子によりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号13に示した。該アミノ酸配列を、解析プログラム[GENETYX WIN ver. 5.0 (ソフトウェア社製)]を用いてヒ

トGPR4のアミノ酸配列と比較したところ、92.7%の一致が認められた。

【0146】

よって、配列番号13で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、マウスのヒトGPR4ホモログ（マウスGPR4）であることが明らかとなった。

従って、マウスGPR4をコードするDNAは、市販、または公知の方法で調製することができるマウスcDNAライブラリーを鋳型にし、配列番号14で表される塩基配列に基づき設計、合成できるオリゴヌクレオチドをプライマーセットに用いたPCRにより取得することができる。

【0147】

参考例13：ラット由来のヒトGPR4ホモログをコードするDNAのクローニング

ヒトGPR4遺伝子の塩基配列情報(AC No. U21051)を基に、NCBIのデータベースを対象として検索を行った。その結果、相同性の高い配列として2つのラットゲノム配列(AC119447.2およびAC096180.2)および複数のラットEST配列(BF544182、AI170948、AI008858、AI235374、AI502871、BQ194515)が選択された。これらの配列と、配列番号14で示したマウスの塩基配列情報を基に配列番号15および配列番号16に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを作製した。

【0148】

該オリゴヌクレオチド各々 $1.0\mu\text{mol/L}$ をプライマーセットとして用い、ラット肺由来mRNAから作製したcDNA $2\mu\text{L}$ を鋳型に用い、後記の各成分の濃度が $200\mu\text{mol/L}$ となるようdNTP (dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、Taq Gold (パーキンエルマー社製) 2.5単位および $1\times$ Taq Gold (Mg plus) 緩衝液(パーキンエルマー社)を含む反応溶液 $40\mu\text{L}$ を調製し、下記条件下でPCRを行った。

【0149】

すなわち、サーマルサイクラーPTC-200 (MJリサーチ社製)を用い、 95°C で10分間加熱後、 94°C で1分間、 55°C で1分間、 72°C で1分間の工程を1サイクルとして30サイクル行い、さらに 72°C で5分間加熱した。

得られたPCR反応液より $5\mu\text{L}$ を分取し、アガロースゲル電気泳動によりGPR4をコードするDNAと予想される約1.1kbのDNA断片が増幅されたことを確認後、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて、該製品に添付されたマニュアル

ルに従い、DNA断片を溶出し回収した。

【0150】

上記で回収したDNA断片50ngとpT7Blue T-Vector (Novagen社製) 50ngとをDNA Ligation kit ver.2 (宝酒造社製) を用いて該製品に添付されたマニュアルに従って連結し、組換えプラスミドDNAを得た。得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換して得られる形質転換株から、常法によりプラスミドpT7RGを得た。プラスミドpT7RGの全塩基配列を決定した結果、pT7RGには配列番号18で表される塩基配列を有する約1.1kbのcDNAが含まれていた。配列番号18で表される塩基配列からなるDNAにコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号17に示した。該アミノ酸配列を、解析プログラム[GENETYX WIN ver. 5.0 (ソフトウェア社製)]を用いてヒト、およびマウスGPR4のアミノ酸配列と比較したところ、それぞれ93.0%、99.2%の一致が認められた。

【0151】

よって、配列番号17で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、ラットのヒトGPR4ホモログ (ラットGPR4) であることが明らかとなった。

【0152】

実施例1：錠剤

常法により、次の組成からなる錠剤を調製する。

処方	化合物 1	20 mg
	乳糖	143.4 mg
	馬鈴薯デンプン	30 mg
	ヒドロキシプロピルセルロース	6 mg
	ステアリン酸マグネシウム	0.6 mg
		<hr/>
		200 mg

【0153】

実施例2：注射剤

常法により、次の組成からなる注射剤を調製する。

処方 化合物 5	2 mg
精製ダイズ油	200 mg
精製卵黄レシチン	24 mg
注射用グリセリン	50 mg
<u>注射用蒸留水</u>	<u>1.72 ml</u>
	2.00 ml

【0 1 5 4】

【発明の効果】

本発明により、GPR4のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質を有効成分として含有する喘息の予防および／または治療剤、および含窒素三環式化合物を有効成分として含有する喘息の予防および／または治療剤が提供される。

【0 1 5 5】

【配列表フリーテキスト】

配列番号 1－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 2－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 3－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 4－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 5－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 6－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 7－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 8－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 9－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 1 0－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 1 5－人工配列の説明：合成DNA
配列番号 1 6－人工配列の説明：合成DNA

【0 1 5 6】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> an agent for preventing and / or treating asthma

<130> H14-072

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 1

tcgacaaata aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcaa 54

<210> 2

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 2

tgcatgtgaaa aaaatgcttt atttgtgaaa ttgtgatgc tattgcttta ttg 54

<210> 3

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 3

tgcatctag ttgtggtttg tccaaactcg agcccgggg 39

<210> 4

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 4

gtacccccgg gctcgagttt ggacaaacca caactagaa

39

<210> 5

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 5

tcgacggtat cgattcgact gacgtcatatc ttgacgtcac

40

<210> 6

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 6

tcgagtgacg tcaagtatga cgtcagtcga atcgataccg

40

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 7

gccccagaag cttaagtgcc caccatggg

29

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 8

gttcattgtg gcggccgcag catcttcagc tgc

33

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 9

cggagactct agagggtata taatg

25

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 10

ctaatacgac tcactatagg g

21

<210> 11

<211> 362

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Gly Asn His Thr Trp Glu Gly Cys His Val Asp Ser Arg Val Asp

1

5

10

15

His Leu Phe Pro Pro Ser Leu Tyr Ile Phe Val Ile Gly Val Gly Leu
20 25 30

Pro Thr Asn Cys Leu Ala Leu Trp Ala Ala Tyr Arg Gln Val Gln Gln
35 40 45

Arg Asn Glu Leu Gly Val Tyr Leu Met Asn Leu Ser Ile Ala Asp Leu
50 55 60

Leu Tyr Ile Cys Thr Leu Pro Leu Trp Val Asp Tyr Phe Leu His His
65 70 75 80

Asp Asn Trp Ile His Gly Pro Gly Ser Cys Lys Leu Phe Gly Phe Ile
85 90 95

Phe Tyr Thr Asn Ile Tyr Ile Ser Ile Ala Phe Leu Cys Cys Ile Ser
100 105 110

Val Asp Arg Tyr Leu Ala Val Ala His Pro Leu Arg Phe Ala Arg Leu
115 120 125

Arg Arg Val Lys Thr Ala Val Ala Val Ser Ser Val Val Trp Ala Thr
130 135 140

Glu Leu Gly Ala Asn Ser Ala Pro Leu Phe His Asp Glu Leu Phe Arg
145 150 155 160

Asp Arg Tyr Asn His Thr Phe Cys Phe Glu Lys Phe Pro Met Glu Gly
165 170 175

Trp Val Ala Trp Met Asn Leu Tyr Arg Val Phe Val Gly Phe Leu Phe
180 185 190

Pro Trp Ala Leu Met Leu Leu Ser Tyr Arg Gly Ile Leu Arg Ala Val
195 200 205

Arg Gly Ser Val Ser Thr Glu Arg Gln Glu Lys Ala Lys Ile Lys Arg
210 215 220

Leu Ala Leu Ser Leu Ile Ala Ile Val Leu Val Cys Phe Ala Pro Tyr
225 230 235 240

His Val Leu Leu Leu Ser Arg Ser Ala Ile Tyr Leu Gly Arg Pro Trp
245 250 255

Asp Cys Gly Phe Glu Glu Arg Val Phe Ser Ala Tyr His Ser Ser Leu
260 265 270

Ala Phe Thr Ser Leu Asn Cys Val Ala Asp Pro Ile Leu Tyr Cys Leu
275 280 285

Val Asn Glu Gly Ala Arg Ser Asp Val Ala Lys Ala Leu His Asn Leu
290 295 300

Leu Arg Phe Leu Ala Ser Asp Lys Pro Gln Glu Met Ala Asn Ala Ser
305 310 315 320

Leu Thr Leu Glu Thr Pro Leu Thr Ser Lys Arg Asn Ser Thr Ala Lys

325

330

335

Ala Met Thr Gly Ser Trp Ala Ala Thr Pro Pro Ser Gln Gly Asp Gln

340

345

350

Val Gln Leu Lys Met Leu Pro Pro Ala Gln

355

360

<210> 12

<211> 2932

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

ctgcagtcag gcggtgaact gacttcatcc caatccctca gccccacca ggaccagtct	60
ggagtccttc ccctgcccc attgaaattt ccttccgtc cccaaactta cctctgatct	120
agaccttact cacctccttc ctgtttccta agactccttc ctgccgtcca cagaccgagc	180
cttttatctt tgtccaccct gtgccagaca cctccttttc cagaaccttc tccttactgg	240
tgaccttact tatctctgtt gctttctggg gtcctaggaa atgccagcac tcccaccac	300
attgcctgaa ctttccaaca ctccctagct gcgctgtgtc ctatctcaac acttcctcat	360
gtatttcttg tgtcttctag aacattcccc cgccattatt acttcaatat ggctacacat	420
acttcctaatt tgccctgcaa accatctcct tctcaccatt gcccagcgat gctttcgtct	480
cctccataaa cactcccga gaccaatttt tgtgtcacc ccatactccc tcgttgacac	540
actgactcca tacataacct ccttgaaaaa cctctttatt aatctcacca tcctccagac	600
ttccctcctg tcataattcc atccctcctc caacttttcc ctctcaagct ctgcccttcc	660
cagcccagcc cagcctaccc aacctcatct ctccctgta gaccacatcc caccatgttc	720
ccctgagcct ccaaggaagg ggctcagggg gcccattggc ctcccgtcc ctgtggcccc	780
acagcccccg tgggccaggg gaagcgcccc agaagccgaa gtgcccacc atg ggc aac	838

Met Gly Asn

1

cac acg tgg gag ggc tgc cac gtg gac tcg cgc gtg gac cac ctc ttt 886
His Thr Trp Glu Gly Cys His Val Asp Ser Arg Val Asp His Leu Phe
5 10 15

ccg cca tcc ctc tac atc ttt gtc atc ggc gtg ggg ctg ccc acc aac 934
Pro Pro Ser Leu Tyr Ile Phe Val Ile Gly Val Gly Leu Pro Thr Asn
20 25 30 35

tgc ctg gct ctg tgg gcg gcc tac cgc cag gtg caa cag cgc aac gag 982
Cys Leu Ala Leu Trp Ala Ala Tyr Arg Gln Val Gln Gln Arg Asn Glu
40 45 50

ctg ggc gtc tac ctg atg aac ctc agc atc gcc gac ctg ctg tac atc 1030
Leu Gly Val Tyr Leu Met Asn Leu Ser Ile Ala Asp Leu Leu Tyr Ile
55 60 65

tgc acg ctg ccg ctg tgg gtg gac tac ttc ctg cac cac gac aac tgg 1078
Cys Thr Leu Pro Leu Trp Val Asp Tyr Phe Leu His His Asp Asn Trp
70 75 80

atc cac ggc ccc ggg tcc tgc aag ctc ttt ggg ttc atc ttc tac acc 1126
Ile His Gly Pro Gly Ser Cys Lys Leu Phe Gly Phe Ile Phe Tyr Thr
85 90 95

aat atc tac atc agc atc gcc ttc ctg tgc tgc atc tcg gtg gac cgc 1174
Asn Ile Tyr Ile Ser Ile Ala Phe Leu Cys Cys Ile Ser Val Asp Arg

100

105

110

115

tac ctg gct gtg gcc cac cca ctc cgc ttc gcc cgc ctg cgc cgc gtc 1222

Tyr Leu Ala Val Ala His Pro Leu Arg Phe Ala Arg Leu Arg Arg Val

120

125

130

aag acc gcc gtg gcc gtg agc tcc gtg gtc tgg gcc acg gag ctg ggc 1270

Lys Thr Ala Val Ala Val Ser Ser Val Val Trp Ala Thr Glu Leu Gly

135

140

145

gcc aac tcg gcg ccc ctg ttc cat gac gag ctc ttc cga gac cgc tac 1318

Ala Asn Ser Ala Pro Leu Phe His Asp Glu Leu Phe Arg Asp Arg Tyr

150

155

160

aac cac acc ttc tgc ttt gag aag ttc ccc atg gaa ggc tgg gtg gcc 1366

Asn His Thr Phe Cys Phe Glu Lys Phe Pro Met Glu Gly Trp Val Ala

165

170

175

tgg atg aac ctc tat cgg gtg ttc gtg ggc ttc ctc ttc ccg tgg gcg 1414

Trp Met Asn Leu Tyr Arg Val Phe Val Gly Phe Leu Phe Pro Trp Ala

180

185

190

195

ctc atg ctg ctg tcg tac cgg ggc atc ctg cgg gcc gtg cgg ggc agc 1462

Leu Met Leu Leu Ser Tyr Arg Gly Ile Leu Arg Ala Val Arg Gly Ser

200

205

210

gtg tcc acc gag cgc cag gag aag gcc aag atc aag cgg ctg gcc ctc 1510

Val Ser Thr Glu Arg Gln Glu Lys Ala Lys Ile Lys Arg Leu Ala Leu

215

220

225

agc ctc atc gcc atc gtg ctg gtc tgc ttt gcg ccc tat cac gtg ctc 1558

Ser Leu Ile Ala Ile Val Leu Val Cys Phe Ala Pro Tyr His Val Leu

230

235

240

ttg ctg tcc cgc agc gcc atc tac ctg ggc cgc ccc tgg gac tgc ggc 1606

Leu Leu Ser Arg Ser Ala Ile Tyr Leu Gly Arg Pro Trp Asp Cys Gly

245

250

255

ttc gag gag cgc gtc ttt tct gca tac cac agc tca ctg gct ttc acc 1654

Phe Glu Glu Arg Val Phe Ser Ala Tyr His Ser Ser Leu Ala Phe Thr

260

265

270

275

agc ctc aac tgt gtg gcg gac ccc atc ctc tac tgc ctg gtc aac gag 1702

Ser Leu Asn Cys Val Ala Asp Pro Ile Leu Tyr Cys Leu Val Asn Glu

280

285

290

ggc gcc cgc agc gat gtg gcc aag gcc ctg cac aac ctg ctc cgc ttt 1750

Gly Ala Arg Ser Asp Val Ala Lys Ala Leu His Asn Leu Leu Arg Phe

295

300

305

ctg gcc agc gac aag ccc cag gag atg gcc aat gcc tcg ctc acc ctg 1798

Leu Ala Ser Asp Lys Pro Gln Glu Met Ala Asn Ala Ser Leu Thr Leu

310

315

320

gag acc cca ctc acc tcc aag agg aac agc aca gcc aaa gcc atg act 1846

Glu Thr Pro Leu Thr Ser Lys Arg Asn Ser Thr Ala Lys Ala Met Thr

325

330

335

ggc agc tgg gcg gcc act ccg ccc tcc cag ggg gac cag gtg cag ctg 1894
Gly Ser Trp Ala Ala Thr Pro Pro Ser Gln Gly Asp Gln Val Gln Leu
340 345 350 355

aag atg ctg ccg cca gca caa tga accccgagtg gcacagaatc cccagttttc 1948
Lys Met Leu Pro Pro Ala Gln
360

ccctctcatc ccacagtccc ttctctcctg gtctgggtgta tgcaaattgt atggaaaaag 2008
ggctgtgtta atattcataa gaatacaaga acttaggaag agtgaggttg gtgtgtcact 2068
gggtcaacctt tgtgctccca gatcccatca cagtttggcg attgtggagg gcctcctgaa 2128
ggaggagatg agtaaataa tttttttgga gacaggggtct cactgtgttg cccaggctgg 2188
agtgcagtag tgcagtcgtg gctcactgca gcctccacct cctgggctct ccagcgatct 2248
tcccacatca gcctcccag tagctgggac cacaaatgtg agcccacca tgcctggcta 2308
atttttgtac tttttgtata aatggagtct cactatgttt ccccaggctg atcttgaact 2368
cctgggctca agagatcctc ctgccttggc ctcccaaagt gctcagatta gagatgtgag 2428
ccgccatgtc tggccagata aattaagtca aacatttggg ttccagaaaa taaagacaaa 2488
tagagaagggt tagatTTTTT tttttccaac aagtggataa aagtctgtga ctcgggggaa 2548
agtggaagga gaaatgcagc cgatatagag tcattatgtt tgcaaagccc ctggtcatac 2608
aggccaggga acataagacc gcaattctaa gtttctagat aaacagcgat ctccaagtca 2668
agactgagga tgaagaggga gaatgtcaga actcaagtga agggcaatca gggcagactg 2728
cctggaggag tgatgccaga aggtttggga agaagggtgtg ggacaagaag aaagggtatt 2788
tattcattca ttcaacagag gtttatgtag ggcactgtgc tgggtggggc tggggacaca 2848
acaatgactg aggcagcctg gccttgccct cacagggctc accatacaca agtaaataaa 2908
aaatatgtaa tgtttggaa tgct 2932

<210> 13

<211> 365

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Met Asp Asn Ser Thr Gly Thr Gly Glu Gly Cys His Val Asp Ser Arg
1 5 10 15

Val Asp His Leu Phe Pro Pro Ser Leu Tyr Ile Phe Val Ile Gly Val
20 25 30

Gly Leu Pro Thr Asn Cys Leu Ala Leu Trp Ala Ala Tyr Arg Gln Val
35 40 45

Arg Gln His Asn Glu Leu Gly Val Tyr Leu Met Asn Leu Ser Ile Ala
50 55 60

Asp Leu Leu Tyr Ile Cys Thr Leu Pro Leu Trp Val Asp Tyr Phe Leu
65 70 75 80

His His Asp Asn Trp Ile His Gly Pro Gly Ser Cys Lys Leu Phe Gly
85 90 95

Phe Ile Phe Tyr Ser Asn Ile Tyr Ile Ser Ile Ala Phe Leu Cys Cys
100 105 110

Ile Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala Val Ala His Pro Leu Arg Phe Ala
115 120 125

Arg Leu Arg Arg Val Lys Thr Ala Val Ala Val Ser Ser Val Val Trp

130

135

140

Ala Thr Glu Leu Gly Ala Asn Ser Ala Pro Leu Phe His Asp Glu Leu

145

150

155

160

Phe Arg Asp Arg Tyr Asn His Thr Phe Cys Phe Glu Lys Phe Pro Met

165

170

175

Glu Arg Trp Val Ala Trp Met Asn Leu Tyr Arg Val Phe Val Gly Phe

180

185

190

Leu Phe Pro Trp Ala Leu Met Leu Leu Cys Tyr Arg Gly Ile Leu Arg

195

200

205

Ala Val Gln Ser Ser Val Ser Thr Glu Arg Gln Glu Lys Val Lys Ile

210

215

220

Lys Arg Leu Ala Leu Ser Leu Ile Ala Ile Val Leu Val Cys Phe Ala

225

230

235

240

Pro Tyr His Ala Leu Leu Leu Ser Arg Ser Ala Val Tyr Leu Gly Arg

245

250

255

Pro Trp Asp Cys Gly Phe Glu Glu Arg Val Phe Ser Ala Tyr His Ser

260

265

270

Ser Leu Ala Phe Thr Ser Leu Asn Cys Val Ala Asp Pro Ile Leu Tyr

275

280

285

Cys Leu Val Asn Glu Gly Ala Arg Ser Asp Val Ala Lys Ala Leu His
290 295 300

Asn Leu Leu Arg Phe Leu Ala Ser Asn Lys Pro Gln Glu Met Ala Asn
305 310 315 320

Ala Ser Leu Thr Leu Glu Thr Pro Leu Thr Ser Lys Arg Ser Thr Thr
325 330 335

Gly Lys Ser Ser Gly Ala Val Trp Ala Val Pro Pro Thr Ala Gln Gly
340 345 350

Asp Gln Val Pro Leu Lys Val Leu Leu Pro Pro Ala Gln
355 360 365

<210> 14

<211> 1098

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 14

atg gac aac agc acg ggc aca ggg gag ggc tgc cat gtg gac tct cga 48

Met Asp Asn Ser Thr Gly Thr Gly Glu Gly Cys His Val Asp Ser Arg

1

5

10

15

gtg gac cac ctc ttc cca cca tct ctc tac atc ttc gtc atc ggg gtg 96

Val Asp His Leu Phe Pro Pro Ser Leu Tyr Ile Phe Val Ile Gly Val

20

25

30

ggg ctg ccc acc aac tgc ctg gcc ctg tgg gca gcc tac cgg cag gtg 144

Gly Leu Pro Thr Asn Cys Leu Ala Leu Trp Ala Ala Tyr Arg Gln Val

35

40

45

cgc caa cac aat gag ctg ggc gtc tac ctg atg aac ttg agc att gca 192

Arg Gln His Asn Glu Leu Gly Val Tyr Leu Met Asn Leu Ser Ile Ala

50

55

60

gac ctg ctg tac atc tgc act ttg ccg ctg tgg gtc gac tac ttc ctc 240

Asp Leu Leu Tyr Ile Cys Thr Leu Pro Leu Trp Val Asp Tyr Phe Leu

65

70

75

80

cac cat gac aac tgg atc cac ggc cct ggc tcc tgc aag ctc ttt ggc 288

His His Asp Asn Trp Ile His Gly Pro Gly Ser Cys Lys Leu Phe Gly

85

90

95

ttc atc ttc tac agc aac atc tat atc agc atc gcc ttc ctg tgc tgc 336

Phe Ile Phe Tyr Ser Asn Ile Tyr Ile Ser Ile Ala Phe Leu Cys Cys

100

105

110

atc tcc gtg gac cgc tac ctg gct gtg gct cat cct ctg cgc ttt gca 384

Ile Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala Val Ala His Pro Leu Arg Phe Ala

115

120

125

cgc ctg cgc cgg gtc aag aca gca gtg gct gtg agc tct gtg gtc tgg 432

Arg Leu Arg Arg Val Lys Thr Ala Val Ala Val Ser Ser Val Val Trp

130

135

140

gcc acg gag ctg ggc gcc aat tca gca ccg ctc ttc cat gat gag ctg 480
Ala Thr Glu Leu Gly Ala Asn Ser Ala Pro Leu Phe His Asp Glu Leu
145 150 155 160

ttt cgt gat cgc tac aac cac acc ttc tgc ttt gag aag ttc ccc atg 528
Phe Arg Asp Arg Tyr Asn His Thr Phe Cys Phe Glu Lys Phe Pro Met
165 170 175

gag cgt tgg gtg gcc tgg atg aat ctg tac cgc gtc ttt gtg ggc ttc 576
Glu Arg Trp Val Ala Trp Met Asn Leu Tyr Arg Val Phe Val Gly Phe
180 185 190

ctc ttc ccc tgg gca ctc atg ttg ctg tgc tac cgt ggc atc ctg agg 624
Leu Phe Pro Trp Ala Leu Met Leu Leu Cys Tyr Arg Gly Ile Leu Arg
195 200 205

gca gtg cag agc agt gtg tcc acc gag cgc cag gag aaa gtc aag atc 672
Ala Val Gln Ser Ser Val Ser Thr Glu Arg Gln Glu Lys Val Lys Ile
210 215 220

aaa cgt ctg gcc ctg agc ctc atc gcc att gtg ctg gtg tgc ttt gcg 720
Lys Arg Leu Ala Leu Ser Leu Ile Ala Ile Val Leu Val Cys Phe Ala
225 230 235 240

cct tac cat gct ctc ctg ctg tct cgc agc gcc gtc tac ctg ggc cgg 768
Pro Tyr His Ala Leu Leu Leu Ser Arg Ser Ala Val Tyr Leu Gly Arg
245 250 255

ccc tgg gac tgt ggc ttc gag gag cga gtc ttt tct gcc tac cac agc 816

Pro Trp Asp Cys Gly Phe Glu Glu Arg Val Phe Ser Ala Tyr His Ser
 260 265 270

tcc ctg gcc ttc acc agc ctc aat tgt gtg gct gac ccc atc ctc tac 864
 Ser Leu Ala Phe Thr Ser Leu Asn Cys Val Ala Asp Pro Ile Leu Tyr
 275 280 285

tgc ctg gtc aac gag ggt gcc cgc agt gat gtg gcc aag gcc ctg cac 912
 Cys Leu Val Asn Glu Gly Ala Arg Ser Asp Val Ala Lys Ala Leu His
 290 295 300

aac ctc ctc cgc ttc ctg gcc agc aac aag ccc cag gag atg gcc aat 960
 Asn Leu Leu Arg Phe Leu Ala Ser Asn Lys Pro Gln Glu Met Ala Asn
 305 310 315 320

gct tcc ctc acc ctg gag aca ccc ttg acc tcc aag agg agc acc acc 1008
 Ala Ser Leu Thr Leu Glu Thr Pro Leu Thr Ser Lys Arg Ser Thr Thr
 325 330 335

ggc aag tcg tcc ggg gct gtc tgg gca gtg cct ccg act gcc cag ggg 1056
 Gly Lys Ser Ser Gly Ala Val Trp Ala Val Pro Pro Thr Ala Gln Gly
 340 345 350

gac cag gtg cca ctg aag gtg ctg ctg ccc ccg gca cag tga 1098
 Asp Gln Val Pro Leu Lys Val Leu Leu Pro Pro Ala Gln
 355 360 365

<210> 15

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 15

ataagcttgccaccatggacaacagcacgggcac

36

<210> 16

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 16

tagcgccgctcactgtgccgggggcagcag

33

<210> 17

<211> 365

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 17

Met Asp Asn Ser Thr Gly Thr Trp Glu Gly Cys His Val Asp Ser Arg

1

5

10

15

Val Asp His Leu Phe Pro Pro Ser Leu Tyr Ile Phe Val Ile Gly Val

20

25

30

Gly Leu Pro Thr Asn Cys Leu Ala Leu Trp Ala Ala Tyr Arg Gln Val

35

40

45

Arg Gln Arg Asn Glu Leu Gly Val Tyr Leu Met Asn Leu Ser Ile Ala

50

55

60

Asp Leu Leu Tyr Ile Cys Thr Leu Pro Leu Trp Val Asp Tyr Phe Leu

65

70

75

80

His His Asp Asn Trp Ile His Gly Pro Gly Ser Cys Lys Leu Phe Gly

85

90

95

Phe Ile Phe Tyr Ser Asn Ile Tyr Ile Ser Ile Ala Phe Leu Cys Cys

100

105

110

Ile Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala Val Ala His Pro Leu Arg Phe Ala

115

120

125

Arg Leu Arg Arg Val Lys Thr Ala Val Ala Val Ser Ser Val Val Trp

130

135

140

Ala Thr Glu Leu Gly Ala Asn Ser Ala Pro Leu Phe His Asp Glu Leu

145

150

155

160

Phe Arg Asp Arg Tyr Asn His Thr Phe Cys Phe Glu Lys Phe Pro Met

165

170

175

Glu Arg Trp Val Ala Trp Met Asn Leu Tyr Arg Val Phe Val Gly Phe

180

185

190

Leu Phe Pro Trp Ala Leu Met Leu Leu Cys Tyr Arg Gly Ile Leu Arg

195

200

205

Ala Val Gln Ser Ser Val Ser Thr Glu Arg Gln Glu Lys Val Lys Ile

210

215

220

Lys Arg Leu Ala Leu Ser Leu Ile Ala Ile Val Leu Val Cys Phe Ala

225

230

235

240

Pro Tyr His Ala Leu Leu Leu Ser Arg Ser Ala Val Tyr Leu Gly Arg

245

250

255

Pro Trp Asp Cys Gly Phe Glu Glu Arg Val Phe Ser Ala Tyr His Ser

260

265

270

Ser Leu Ala Phe Thr Ser Leu Asn Cys Val Ala Asp Pro Ile Leu Tyr

275

280

285

Cys Leu Val Asn Glu Gly Ala Arg Ser Asp Val Ala Lys Ala Leu His

290

295

300

Asn Leu Leu Arg Phe Leu Ala Ser Asn Lys Pro Gln Glu Met Ala Asn

305

310

315

320

Ala Ser Leu Thr Leu Glu Thr Pro Leu Thr Ser Lys Arg Ser Thr Thr
325 330 335

Gly Lys Thr Ser Gly Ala Val Trp Ala Val Pro Pro Thr Ala Gln Gly
340 345 350

Asp Gln Val Pro Leu Lys Val Leu Leu Pro Pro Ala Gln
355 360 365

<210> 18

<211> 1098

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 18

atg gac aac agc acg ggc acg tgg gag ggc tgc cat gtg gac tct cga 48

Met Asp Asn Ser Thr Gly Thr Trp Glu Gly Cys His Val Asp Ser Arg

1 5 10 15

gtg gac cac ctc ttc cca cca tcc ctc tac atc ttc gtc atc ggg gtg 96

Val Asp His Leu Phe Pro Pro Ser Leu Tyr Ile Phe Val Ile Gly Val

20 25 30

ggg ctg ccc acc aac tgc ctg gcc ctg tgg gca gcc tac cgc cag gtg 144

Gly Leu Pro Thr Asn Cys Leu Ala Leu Trp Ala Ala Tyr Arg Gln Val

35 40 45

cgc cag cgc aat gag ctg ggc gtc tac ctg atg aac ttg agc atc gca 192

Arg Gln Arg Asn Glu Leu Gly Val Tyr Leu Met Asn Leu Ser Ile Ala
 50 55 60

gac ctg ctg tac atc tgt acg ctg ccg ctg tgg gtc gac tac ttc ctc 240
 Asp Leu Leu Tyr Ile Cys Thr Leu Pro Leu Trp Val Asp Tyr Phe Leu
 65 70 75 80

cac cat gac aac tgg atc cac ggc ccc ggc tcc tgc aag ctc ttt ggc 288
 His His Asp Asn Trp Ile His Gly Pro Gly Ser Cys Lys Leu Phe Gly
 85 90 95

ttc atc ttc tac agc aac atc tac atc agc atc gcc ttc ctg tgc tgc 336
 Phe Ile Phe Tyr Ser Asn Ile Tyr Ile Ser Ile Ala Phe Leu Cys Cys
 100 105 110

atc tcc gtg gac cgc tac ctg gct gtg gcc cat ccg ctg cgc ttt gcg 384
 Ile Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala Val Ala His Pro Leu Arg Phe Ala
 115 120 125

cgc ctg cgc cgg gtc aag aca gca gta gct gtg agc tcc gtg gtc tgg 432
 Arg Leu Arg Arg Val Lys Thr Ala Val Ala Val Ser Ser Val Val Trp
 130 135 140

gcc acc gag cta ggc gcc aac tcg gca ccg ctc ttt cat gac gag ctc 480
 Ala Thr Glu Leu Gly Ala Asn Ser Ala Pro Leu Phe His Asp Glu Leu
 145 150 155 160

ttt cgt gat cgc tac aac cac acc ttc tgc ttc gag aag ttc ccc atg 528
 Phe Arg Asp Arg Tyr Asn His Thr Phe Cys Phe Glu Lys Phe Pro Met

165

170

175

gag cgc tgg gtg gcc tgg atg aac ctg tac cgc gtc ttt gtg ggg ttc 576

Glu Arg Trp Val Ala Trp Met Asn Leu Tyr Arg Val Phe Val Gly Phe

180

185

190

ctc ttc ccc tgg gca ctc atg ttg ctg tgc tac cgc ggc atc ctg cgg 624

Leu Phe Pro Trp Ala Leu Met Leu Leu Cys Tyr Arg Gly Ile Leu Arg

195

200

205

gcc gta cag agc agt gtg tcc acc gag cgc cag gag aaa gtc aag atc 672

Ala Val Gln Ser Ser Val Ser Thr Glu Arg Gln Glu Lys Val Lys Ile

210

215

220

aaa cgc ctg gcc ctg agc ctc atc gcc atc gtg ctg gtg tgc ttt gca 720

Lys Arg Leu Ala Leu Ser Leu Ile Ala Ile Val Leu Val Cys Phe Ala

225

230

235

240

ccc tac cat gct ctc ttg ctg tct cgc agc gct gtc tat ctg ggc cgg 768

Pro Tyr His Ala Leu Leu Leu Ser Arg Ser Ala Val Tyr Leu Gly Arg

245

250

255

ccc tgg gac tgt ggc ttc gag gag cga gtc ttc tct gcc tac cac agc 816

Pro Trp Asp Cys Gly Phe Glu Glu Arg Val Phe Ser Ala Tyr His Ser

260

265

270

tcc cta gcc ttc acc agc ctc aat tgc gtg gct gac ccc atc ctc tac 864

Ser Leu Ala Phe Thr Ser Leu Asn Cys Val Ala Asp Pro Ile Leu Tyr

275

280

285

tgc ctg gtc aac gag ggt gcc cgt agt gac gtg gcc aaa gcc ctg cac 912

Cys Leu Val Asn Glu Gly Ala Arg Ser Asp Val Ala Lys Ala Leu His

290

295

300

aac ctc ctc cgc ttc ctg gcc agc aac aag ccc cag gag atg gcc aat 960

Asn Leu Leu Arg Phe Leu Ala Ser Asn Lys Pro Gln Glu Met Ala Asn

305

310

315

320

gct tcc ctc acc ctg gag aca cca ttg acc tcc aag agg agc acc acc 1008

Ala Ser Leu Thr Leu Glu Thr Pro Leu Thr Ser Lys Arg Ser Thr Thr

325

330

335

ggc aaa acg tct ggg gct gtc tgg gca gtg cct ccc act gcc cag ggg 1056

Gly Lys Thr Ser Gly Ala Val Trp Ala Val Pro Pro Thr Ala Gln Gly

340

345

350

gac cag gtg cca ctg aag gtg ctg ctg ccc ccg gca cag tga 1098

Asp Gln Val Pro Leu Lys Val Leu Leu Pro Pro Ala Gln

355

360

365

【図面の簡単な説明】

【図 1】 化合物 1（腹腔内投与）の抗原誘発気道収縮に対する抑制作用を示す図である。

【符号の説明】

: p=0.0043（陽性対照群の陰性対照群対比；student's t-test）

** : p=0.0047（化合物 1 腹腔内投与群の陽性対照群対比；student's t-test

）

【図 2】 化合物 1（経口投与）の抗原誘発気道収縮に対する抑制作用を示す図である。

【符号の説明】

: $p < 0.0001$ （陽性対照群の陰性対照群対比；student's t-test）

* : $p = 0.0248$ （化合物 1 経口投与群の陽性対照群対比；student's t-test

）

【書類名】

図面

【図 1】

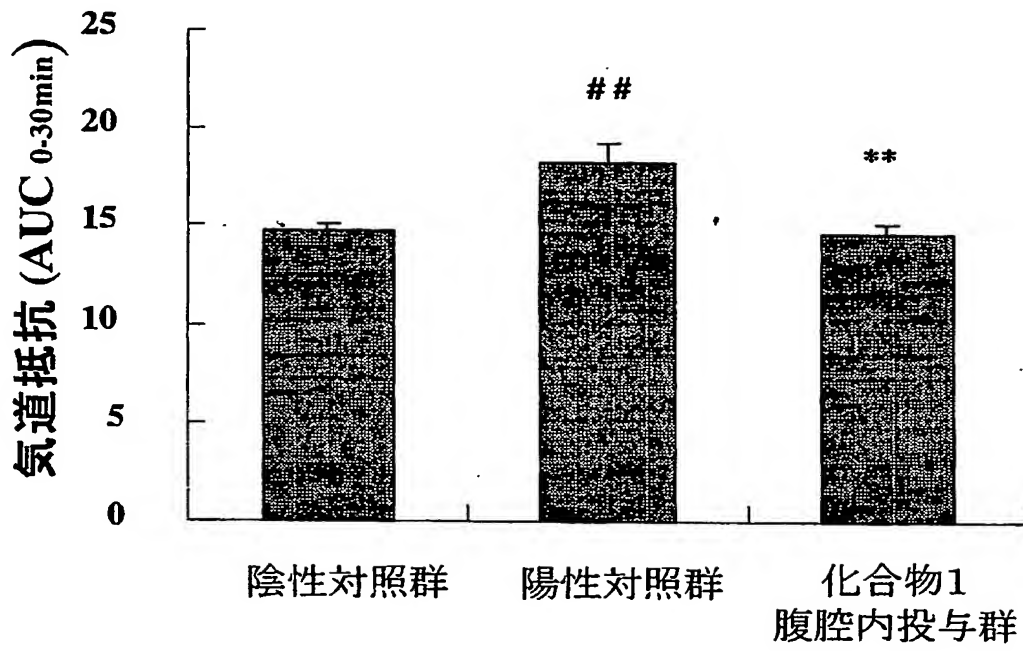


図 1

【図 2】

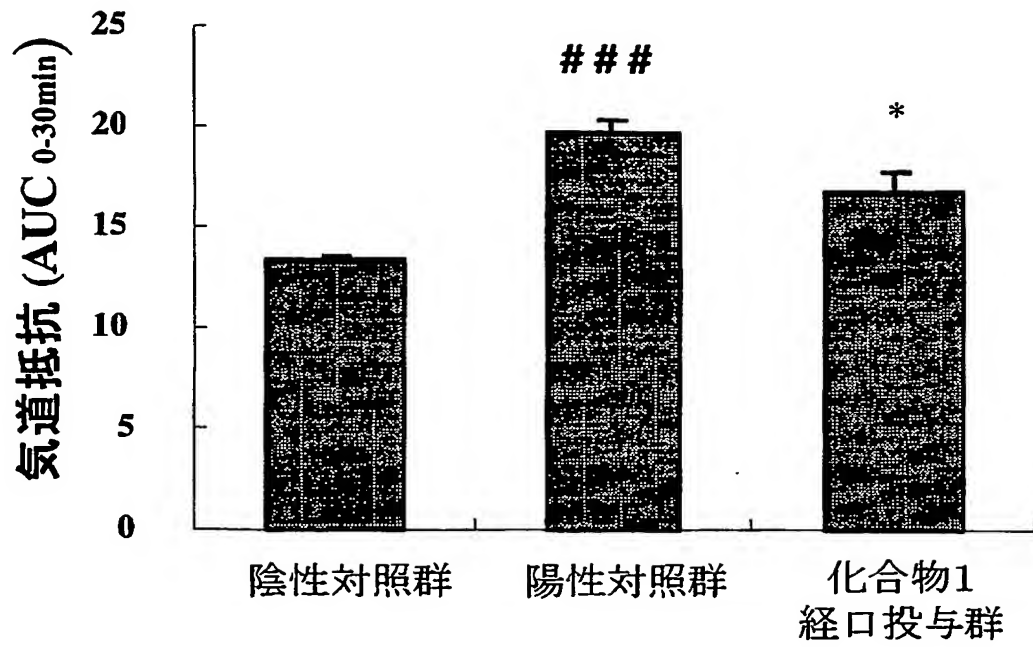


図 2

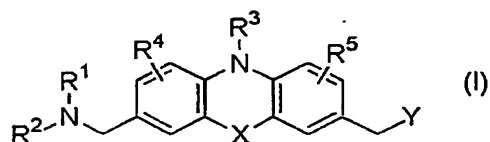
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 喘息の予防および／または治療剤を提供すること。

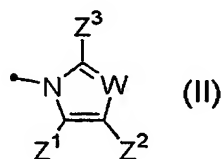
【解決手段】 GPR4のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質を有効成分として含有する喘息の予防および／または治療剤を提供する。また、式 (I)

【化9】



[式中、 R^1 および R^2 は同一または異なって水素等を表すか、 R^1 および R^2 が隣接する窒素原子と一緒になって置換もしくは非置換の複素環基を形成し、 R^3 は水素等を表し、 R^4 および R^5 は同一または異なって水素等を表し、 X は $-(CH_2)_2-$ または $-CH=CH-$ を表し、 Y は式 (II)

【化10】



(式中、 W は CH または窒素原子を表し、 Z^1 および Z^2 は同一または異なって水素等を表し、 Z^3 は水素等を表す) を表す] で表される含窒素三環式化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する喘息の予防および／または治療剤を提供する。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 2 - 2 4 1 5 2 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 1 0 2 9]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 6 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区大手町 1 丁目 6 番 1 号

氏 名

協和醗酵工業株式会社